

Effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur les marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la paraoxonase 1 (PON1) chez les femmes postménopausées et obèses

Par

Gérémy Abdull KOUMBADINGA

Département de Sciences Cliniques
(Gériatrie)

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences Cliniques

Décembre 2006



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-37886-1
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-37886-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

À la mémoire de ma mère

Remerciements :

Ces deux dernières années comptent parmi les plus enrichissantes de ma vie académique. Cela ne l'aurait pas été sans le concours de plusieurs personnes qui ont su m'entourer tout au long de cette période. Ces quelques lignes leurs sont particulièrement adressées.

D'entrée, je voudrais particulièrement remercier le Dr. Abdel Khalil pour toute la confiance qu'il m'a portée dès notre première rencontre et tout au long de mon cycle de maîtrise. J'aimerais vivement le remercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et accepté de diriger mes travaux. J'ai toujours trouvé auprès de lui la patience, la compréhension et le lot de bons conseils qui m'ont permis de mener au mieux ce travail. Qu'il trouve par ces mots le témoignage de ma profonde gratitude.

D'autre part, j'aimerais exprimer ma grande reconnaissance au Dre Isabelle Dionne pour avoir bien voulu accepter de codiriger mes travaux et pour sa remarquable disponibilité tout au long de mon apprentissage. Elle a toujours su combler la moindre de mes lacunes à travers son bon sens de la pédagogie. Qu'elle voit ici l'expression de ma respectueuse admiration.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Hicham Berrougui, au Dre Mounia Cherki, au Dre Mylène Aubertin-Leheudre, au Dre Nadine Douziech et à Martin Cloutier pour leur support et leur patience tout au long de mon apprentissage de laboratoire. Sans leur soutien précieux, je crois que je serais encore loin d'avoir conclu ces travaux. Pour ça, je les remercie vivement. J'aimerais également remercier tout le personnel de l'axe physique-biologique pour l'ambiance conviviale et stimulante qu'ils entretiennent sur notre étage.

Je terminerai en remerciant mes proches, notamment mes amis Takane et Boris, pour leur présence et leur soutien dans les moments les plus durs. À mes frère Hans, Dave et Arthur qui par leurs pensées me portent et me donnent la force d'aller jusqu'au bout de nos rêves.

Je dédie ce mémoire à deux personnes toutes particulières : à ma petite sœur Gencia, la jeune femme la plus courageuse du monde. À ma mère qui n'est plus de ce monde et qui de là où elle se trouve continue toujours de veiller sur moi

Table des matières

I-	INTRODUCTION.....	1
	1.1 Épidémiologie.....	1
	1.2 Généralité.....	4
	1.2.1 Ménopause.....	4
	1.2.2 Physiologie hormonale de la ménopause.....	4
	1.2.3 Symptômes de la ménopause.....	5
	1.2.4 Modifications métaboliques liées à la ménopause.....	6
	1.2.5 Syndrome métabolique.....	6
	1.3 Dyslipidémie.....	7
	1.3.1 Les lipides.....	7
	1.3.2 Les lipoprotéines.....	8
	1.3.2.1 Les chylomicrons.....	8
	1.3.2.2 Les lipoprotéines de très faibles densité (VLDL).....	9
	1.3.2.3 Les lipoprotéines de faible densité (LDL).....	9
	a- Rôle physiologique des LDL.....	10
	b- Modifications oxydatives des LDL.....	10
	c- Oxydation lipidique des LDL.....	10
	d- Oxydation protéique des LDL.....	11
	1.3.2.4 Les lipoprotéines de haute densité.....	11
	a- Métabolisme des HDL.....	12
	b- Rôle physiologique des HDL.....	13
	1.4 L'athérosclérogénèse.....	13

1.5 Le système pro-oxydant.....	17
1.5.1 Les métaux de transition.....	17
1.5.2 Espèces oxygènes réactives.....	18
1.5.3 Espèces nitrogènes réactives.....	18
1.5.4 La myéloperoxydase.....	19
1.6 Le système antioxydant.....	20
1.6.1 Le système antioxydant actif.....	21
1.6.1.1 Le superoxyde dismutase (SOD).....	21
1.6.1.2 Le glutathion peroxydase.....	22
1.6.1.3 La catalase.....	23
1.6.2 Le système antioxydant passif.....	25
1.6.2.1 L'α-tocophérol.....	25
1.6.2.2 L'acide ascorbique.....	26
1.6.2.3 L'ubiquinol 10.....	28
1.7 Rôle des HDL dans l'efflux du cholestérol et l'hydrolyse des lipides oxydés	28
1.7.1 La paraoxonase 1.....	32
1.8 La leptine.....	33
1.8.1 Physiologie de la leptine.....	33
1.8.2 Rôle de la leptine dans l'athérosclérogénèse.....	34
1.9 Traitement des complications liées à l'obésité.....	35
1.9.1 Effet des hormones de substitution (THS) sur l'incidence des MCV chez les femmes postménopausées et obèses.....	35

1.9.2 Les phytoestrogènes.....	38
1.9.2.1 Métabolisme des phytoestrogènes.....	39
a- Métabolisme des isoflavones.....	39
1.9.2.2 Intérêts cliniques des phytoestrogènes.....	40
1.9.2.3 Phytoestrogènes et maladies cardiovasculaires.....	40
1.9.2.4 Phytoestrogènes et cancers.....	43
1.10 Effet de l'exercice physique sur l'incidence des maladies cardio- vasculaires.....	44
1.11 Conclusion sommaire.....	47
II- HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	49
III- MÉTHODOLOGIE.....	50
3.1 Devis de recherche et dispositif de l'étude.....	50
3.2 Recrutement des sujets.....	52
3.3. Critères d'inclusion.....	52
3.4 Variables à l'étude.....	53
3.4.1 Variables indépendantes.....	53
3.4.2 Variables dépendantes.....	54
3.4.3 Déroulement de l'étude.....	54
3.5 Échantillons sanguins.....	55
3.6 Composition corporelle.....	55
3.7 Mesure de l'activité antioxydante totale.....	56
3.8 Dosage de la vitamine C.....	57

3.9 Dosage de la vitamine E.....	58
3.9 Dosage des diènes conjugués.....	59
3.10 Dosage des dialdéhydes maloniques (MDA).....	59
3.11 Mesure de l'activité de la paraoxonase 1.....	59
3.12 Efflux du cholestérol.....	60
3.13 Dosage de la leptine.....	62
3.14 Analyse statistique.....	63
IV- RÉSULTATS.....	64
4.1 Activité antioxydante totale (AAOT).....	66
4.2 Activité antioxydante résiduelle (AoGap).....	66
4.3 Vitamine C.....	69
4.4 Vitamine E.....	69
4.5 Diènes conjugués	73
4.6 Dialdéhydes maloniques.....	73
4.7 Activité arylestérase.....	76
4.8 Activité paraoxonase.....	78
4.9 Efflux du cholestérol.....	78
4.10 Leptine.....	82
V- DISCUSSION.....	84
VI- CONCLUSION.....	92

Indexe des tableaux et figures

Figure 1: Initiation de l'athérosclérose	16
Figure 2: Interaction des différents systèmes pro-oxydants et antioxydants	24
Figure 3: Régénération de l' α -tocophérol par l'acide ascorbique	27
Figure 4: Rôles potentiels des HDL dans l'inhibition des l'athérosclérogénèse	31
Figure 5: Dispositif de l'étude	51
Tableau 1: Caractéristiques des sujets au début de l'étude	64
Tableau 2 : Caractéristiques des sujets ayant complété l'étude.....	65
Figure 6: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité antioxydante totale .	67
Figure 7: Effet des phytoestrogènes sur l'activité antioxydante résiduelle	68
Figure 8: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur la teneur en vitamine C	71
Figure 9: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur la vitamine E plasmatique	72
Figure 10 : Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur les diènes conjugués	74
Figure 11 : Effet des phytoestrogènes sur la concentration plasmatique des MDA	75
Figure 12: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité arylestérase	77
Figure 13: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité paraoxonase	80
Figure 14: Efflux du cholestérol chez les sujets ayant un profil lipidique normal	79
Figure 15: Efflux du cholestérol chez les sujets ayant un profil lipidique altéré	81
Figure 16: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur la concentration de leptine plasmatique	83

Abréviations

AAOT : Activité antioxydante totale

ABTS : 2,2-azinobis-(3-athylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

AoGap : Activité antioxydante résiduelle

α -TOH : alpha tocophérol

CAT : catalase

ET-1 : endothéline-1

GPX : glutathion peroxydase

GSSG : glutathion dissulfide

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

ICAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire de type 1

MAT: Mataïrésinol

MCP-1 : Monocyte chémoattractive protéine-1

MDA : Dialdéhydes maloniques

NOS : Espèces nitrogènes réactives

NPY : neuropeptide Y

MPO : Myéloperoxydase

O-DMA : O-dysmétylangiolensine

oxLDL : Lipoprotéine de faible densité oxydée

PMA: Phorbol-ester 12-myristate 13-acétate

PON1 : Paraoxonase 1

ROS : espèces oxygènes réactives.

SECO-DG : Secoïsolariciresinol-diglucoside

SOD: superoxyde dismutase

STAT: activateur et transducteur du signal de la transcription

THS : Thérapie hormonale de substitution.

Résumé

Effets des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur les marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la paraoxonase 1 (PON1) chez les femmes postménopausées et obèses.

Par

Gérémy Abdull Koumbadinga

Département de Sciences Cliniques

Université de Sherbrooke

L'incidence des maladies cardiovasculaires (MCV) dans la population âgée et particulièrement chez les femmes postménopausées en surpoids se montre sans cesse grandissante au fil des années. Cette augmentation de la survenue des MCV serait particulièrement due à une diminution d'œstrogène pendant la ménopause, à une redistribution de la masse grasse au niveau abdominal et à une augmentation de la production des radicaux libres au cours du vieillissement. Bien que les femmes postménopausées utilisent souvent des œstrogènes de synthèse pour soulager les symptômes de la ménopause, plusieurs études prospectives ont montré que la thérapie hormonale de substitution (THS) entraînait également une diminution significative des facteurs de risque des MCV et que des effets synergiques sur l'amélioration du profil lipidique étaient aussi observés lorsque la THS était associée à un programme d'exercices aérobies. Cependant, quelques études longitudinales récemment publiées ont montré que la THS entraînait non seulement une augmentation de l'incidence de cancers, mais aussi que celle-ci augmenterait la survenue d'attaques cardiaques et de maladies coronariennes.

Les phytoestrogènes semblent être une alternative intéressante à la THS. En effet, plusieurs études longitudinales et *in vitro* ont montré que les phytoestrogènes diminuaient l'incidence des MCV en améliorant le profil lipidique et en augmentant la résistance des lipoprotéines de faible densité (LDL) à l'oxydation. Cet effet protecteur des phytoestrogènes à l'égard des LDL semble se faire par l'amélioration de l'activité de

l'enzyme paraoxonase 1 (PON1) présente à la surface des lipoprotéines de haute densité (HDL).

Ainsi, le but de notre étude est d'évaluer l'effet d'une supplémentation en phytoestrogènes associés à l'exercice physique sur les marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la PON1 chez les femmes postménopausées présentant un gain pondéral.

Pour ce faire, nous avons recruté des femmes âgées entre 50 et 75 ans que nous avons aléatoirement réparties en deux groupes, 25 femmes dans le groupes phytoestrogènes et 25 femmes dans le groupe placebo. Ces sujets devaient prendre des phytoestrogènes (70 mg/jour d'isoflavones) ou le placebo pendant une période de six mois, puis les deux groupes, en plus de ces suppléments, étaient soumis à des séances d'exercices aérobies pendant six mois additionnels. Des prélèvements sanguins étaient effectués au début de l'étude, après 6 mois et à la fin de la période de suivie (12 mois). Un certain nombre de marqueurs sanguins du stress oxydatif étaient mesurés, notamment l'activité antioxydante totale (AAOT) et résiduelle (AoGap), les diènes conjugués, les dialdéhydes maloniques (MDA), mais aussi la vitamine C, la vitamine E, l'activité paraoxonase et la leptine

Nos résultats montrent une augmentation significative de la vitamine C et de l'activité paraoxonase dans les deux groupes au bout des 12 mois de suivi et également une diminution significative de la vitamine E dans les deux groupes à l'issue de la même période. Aucune variation significative n'a été observée lors du dosage des autres variables. Ces résultats suggèrent que les phytoestrogènes n'ont aucun effet sur l'ensemble des marqueurs du stress oxydatif, mais que les variations significatives obtenues lors des dosages des vitamines C et E ainsi que de l'activité paraoxonase seraient dues à une réponse adaptative de l'organisme au stress induit par l'exercice physique. L'absence d'effets des phytoestrogènes pourrait aussi s'expliquer par le haut niveau d'abandons observé tout au long de l'étude ou encore par le fait que la dose prescrite n'est pas nécessairement suffisante pour avoir une influence positive sur les différentes variables étudiées.

Mots clés : Thérapie hormonale de substitution, phytoestrogènes, paraoxonase 1, stress oxydant, maladies cardiovasculaires.

I INTRODUCTION

1.1 Épidémiologie

Le développement des lésions athérosclérotiques au niveau des artères de la tête, du cœur et des membres inférieurs, avec pour conséquence l'augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires (MCV), représente depuis quelques années déjà la première cause de mortalité à travers le monde. Avec une plus forte récurrence dans les pays industrialisés comparée aux pays du sud, plusieurs facteurs environnementaux dont le haut niveau de sédentarité et le mode d'alimentation lui ont souvent été attribués.

D'autre part, l'incidence des MCV observée chez les hommes a souvent laissé penser que les femmes y exprimaient une certaine immunité. Pourtant, des études épidémiologiques menées tout au long de ces vingt dernières années montrent une tendance inverse en faveur des hommes. Plus de femmes que d'hommes décèdent, en effet, chaque année d'une attaque cardiaque depuis le début des années 80 (McLarty et al., 2003). Aux USA, approximativement huit (8) millions de femmes vivent présentement avec une maladie cardiaque. Parmi celles ayant subi une attaque cardiaque, 35% en subissent une seconde au cours des 6 années qui suivent la première, contre seulement 18% chez les hommes (Lewis, 2002). À 65 ans, le nombre de décès de MCV chez les femmes est plus élevé de 11% par rapport à celui des hommes.

Une comparaison avec d'autres maladies qui connaissent aussi une très forte incidence chez cette même population, à l'exemple des cancers, montre que la mortalité pour les MCV demeure toujours très élevée.

En 1993, par exemple, plus de 500 387 femmes sont décédées de suite d'une maladie cardio-vasculaire contre 250 529 pour tous les types de cancers confondus aux USA (Crawford et Johannes, 1999). De même, en 1998, 508927 femmes sont mortes d'une MCV contre 41 737 pour le cancer du sein (Lewis, 2002). En 1999, on a enregistré, aux USA toujours, près de 373 575 décès chez les femmes liés à une maladie cardiaque (McLarty et al., 2003) comparé par exemple à 41 528 décès suite au cancer du sein pour la même année.

La sous-estimation marquée de la prévalence des maladies cardiaques chez les femmes découle du fait que celles-ci n'apparaissent qu'assez tard avec l'âge lorsque comparées aux hommes (McLarty et al., 2003). Ce délai est de plus en plus attribué à un effet protecteur exercé par les hormones sexuelles femelles, notamment les œstrogènes au cours de la pré-ménopause (Rossi et al., 2002) et cela, compte tenu du fait qu'on observe que la morbidité et la mortalité, secondaire aux MCV chez les femmes, n'augmentent considérablement qu'après la ménopause (Lewis, 2002). La ménopause est généralement associée à une redistribution de la masse grasse des régions inférieures du corps vers le niveau central. L'obésité abdominale qui survient entraîne une augmentation des facteurs de risque des MCV.

Notre travail vise à évaluer l'effet des phytoestrogènes, associés à l'exercice physique, sur un certain nombre de facteurs de risque des MCV chez les femmes ménopausées et obèses.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présenterons les principes physiologiques et biochimiques de diverses études qui régissent les maladies cardiovasculaires avec comme implication la ménopause, l'obésité et le stress oxydatif, afin de faire le point sur l'ensemble des connaissances actuelles.

Dans la seconde partie, nous justifierons le devis de notre étude en présentant la population à l'étude, l'utilisation des phytoestrogènes, l'exercice physique, ainsi que les différents paramètres à évaluer, notamment les marqueurs du stress oxydatif. Enfin, la troisième partie servira à la présentation et à l'analyse des résultats obtenus à l'issue de notre étude.

1.2 Généralités :

1.2.1 Ménopause :

La ménopause est la cessation permanente du cycle menstruel et de la fonction reproductrice chez la femme. Cet arrêt des menstruations résulte généralement de la perte de la fonction ovarienne folliculaire (Greendale et al., 1999). Wich et Carnes (1995) la définissent classiquement comme une absence systématique de menstruation pendant une période de 6 mois au cours d'une année et dont la durée est déterminée rétrospectivement depuis la dernière menstruation (Wich et Carnes, 1995). Sur le plan clinique, la ménopause est constatée après 12 mois d'aménorrhée avec un âge moyen de survenue de 51 ans (Greendale et al., 1999).

1.2.2 Physiologie hormonale de la ménopause :

La ménopause est précédée par la périménopause. Il s'agit de l'étape transitionnelle qui s'écoule entre la période reproductive et l'arrêt total des menstruations (Prior, 1998) et au cours de laquelle on assiste à des bouleversements importants du milieu hormonal de la femme. Elle survient lorsqu'il y a une déplétion de près de 90% du nombre de follicules primordiaux au niveau des ovaires. Il y a donc une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'œstrogène et progestérone, ainsi qu'un arrêt total de la sécrétion de l'inhibine (Tchernof, Poehlman, & Despres, 2000; Wich & Carnes, 1995), ce qui se traduit par une élévation de la production de FSH et de LH. Les niveaux de FSH atteignent rapidement 10 à 15 fois les valeurs normales en périménopause, tandis que les niveaux de LH demeurent relativement stables encore plusieurs mois après la ménopause (Burger, 1996).

La périmenopause se caractérise biologiquement par une diminution de la fertilité, due à l'exhortion des follicules, aux cycles ovulatoires irréguliers, mais surtout à une augmentation du pourcentage de cycles anovulatoires.

En post-ménopause, l'œstrogène résiduel est l'estrone. Cette dernière dérive de l'aromatisation de l'androsténédione produite par la glande médullosurrénale et les ovaires (Dubey et al., 2004). La conversion de l'androsténédione en estrone se fait dans le foie, l'hypothalamus et le tissu adipeux et a pour but de compenser la diminution de l'œstrogène circulant. La postménopause est donc confirmée par une faible concentration d'œstradiol plasmatique (75.6 ± 20 pmol/L) et des teneurs élevées en LH (21.8 ± 6.7 IU/L) et en FSH (> 40 IU/L) (Rendell et al., 2001).

1.2.3 Symptômes de la ménopause :

Les bouffées de chaleur qui surviennent surtout la nuit, les insomnies, l'anxiété, les sautes d'humeur associées à une forte irritabilité, sont souvent le tableau clinique d'une femme en postménopause (Wich et Carnes, 1995). À ces symptômes vasomoteurs peuvent aussi s'ajouter une atrophie vaginale et une incontinence urinaire caractérisée par une diminution de la sensibilité des récepteurs α -adrénergique de la vessie et du sphincter urétral, mais aussi par un amincissement de la muqueuse urétrale (Greendale et al., 1999).

1.2.4 Modifications métaboliques liées à la ménopause :

Les bouleversements hormonaux qui surviennent au cours de la ménopause ne sont pas sans conséquences sur plusieurs processus physiologiques. En effet, dès la périménopause, on observe une augmentation graduelle des niveaux plasmatique de cholestérol total, des LDL-cholestérol et des triglycérides tandis que les niveaux des HDL-cholestérol demeurent relativement constants, du moins au cours des deux premières années précédant la ménopause (Jensen et al., 1990). Cette altération du profil lipidique pourrait être la conséquence d'une accumulation de gras au niveau abdominal, précisément par un dépôt sous-cutané et viscéral (Rendell et al., 2001). Des études tendent à montrer que le tissu adipeux central pourrait être très lipolytique et libérerait de ce fait d'importantes quantités d'acides gras dans la circulation (Tchernof et al., 2000).

1.2.5 Syndrome métabolique :

L'obésité générale et centrale qui survient après la ménopause a souvent été corrélée avec un certain nombre de complications métaboliques telles que la dyslipidémie, la résistance à l'insuline, l'hypertension et une augmentation des maladies cardio-vasculaires (You , 2004) réunis sous le terme de syndrome métabolique. Pour le National Cholesterol Education Program (NCEP) (Adult Treatment Panel III, 2001), le syndrome métabolique est diagnostiqué quand au moins trois (3) des symptômes suivants sont présents chez la femme : 1) une circonférence de la taille supérieure ou égale à 88 cm; 2) un niveau de triglycéride (TG) supérieur ou égal à 150 mg/dl; 3) des niveaux de HDL-C inférieur à 50 mg/dl; 4) une tension artérielle de 130/85 mm Hg ou plus; 5) des niveaux de glucose

sanguin supérieurs à 110 mg/dl aboutissant ainsi à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires.

1.3 Dyslipidémie

1.3.1 Les lipides

Les lipides sont des substances naturelles qui se définissent par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques. Ils contiennent dans leurs molécules des acides gras à longue chaîne aliphatique et ont principalement trois rôles dans l'organisme humain dont un rôle structural, car ils entrent dans la composition des membranes biologiques, un rôle énergétique par leur mise en réserve sous forme de triglycérides, et enfin un rôle métabolique car ils interviennent comme précurseurs dans la synthèse des hormones stéroïdes, des éicosanoïdes et des transducteurs des signaux intracellulaires tels que l'inositol phosphate et le diacylglycérol (Boulanger et al., 1989).

Chez l'humain, les lipides ont une origine exogène (apport alimentaire) et une origine endogène. À cause de leur hydrophobie, les lipides alimentaires sont émulsionnés par la bile au niveau du tractus intestinal. Ces lipides, sous forme de monoglycérides et d'acides gras, vont traverser la paroi intestinale dans laquelle ils s'aggloméreront au cholestérol et aux molécules de phospholipides après leur conversion en triglycérides. Puis, cet ensemble se recouvre d'une enveloppe protéique et forment ainsi des macromolécules connues sous le nom de chylomicrons avant d'être excrétées dans la circulation sanguine par exocytose (Tortora et Grabowski, 2001).

1.3.2 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires essentiellement constitués de cholestérol estérifié et de triglycérides enveloppés par un feuillet membranaire simple formé de phospholipides, de cholestérol non-estérifié et de protéines. Leur rôle principal est d'assurer le transport plasmatique des lipides. On distingue cinq (5) types de lipoprotéines, regroupées selon leur taille et leur densité. Il s'agit des chylomicrons (CM), des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), des lipoprotéines de faible densité (LDL) et des lipoprotéines de haute densité (HDL).

1.3.2.1 Les chylomicrons :

Les chylomicrons (CM) sont produits en phase postprandiale dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ils transportent le cholestérol, les vitamines liposolubles et les triglycérides, qui représentent la plus grande partie de ses constituants (86%), vers le foie et les tissus périphériques. Ils contiennent environ 7% de phospholipides (PL), 4% de cholestérol estérifié (CE), 2% de cholestérol libre et 2% de protéine (Ming-Lin Liu, 2002). Les CM possèdent plusieurs types d'apoprotéines dont, l'Apo-AI, l'Apo-AIV et l'Apo-B48 qui est l'apoprotéine majeure et qui intervient comme marqueur spécifique des CM (Isherwood et al., 1997). Au cours de leur circulation dans le sang, certaines autres apoprotéines telles que l'Apo-CII et l'Apo-E leur sont transférées à partir des HDL. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), les CM sont progressivement transformés en VLDL et LDL.

1.3.2.2 Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL)

Les VLDL dérivent du foie et sont une continuité de la voie métabolique des CM. Ils contiennent des TG à hauteur de 55% et environ 12% de cholestérol (Ming-Lin Liu, 2002). Leur apoprotéine spécifique est l'Apo-B100, mais d'autres comme l'Apo-E et l'Apo-C₃ lui sont également transférées à partir du HDL. L'hydrolyse par la LPL convertit les VLDL en particules légèrement plus denses, les IDL qui, à leur tour, sont finalement transformées en LDL.

1.3.2.3 Les lipoprotéines de faible densité (LDL)

La conversion des IDL par l'action de la lipoprotéine lipase aboutit à la formation des lipoprotéines de faible densité (LDL). Il s'agit d'une particule sphérique dont le diamètre varie entre 22 et 28 nm avec une densité comprise entre 1.019 et 1.063 g/ml (Ming-Lin Liu, 2002). Les LDL contiennent en moyenne 35 à 45% de CE, 5-11% de TG, 18-24% de PL, 9-11% de FC et 20 à 24% d'apoprotéines dont la plus importante est l'Apo-B100 (Ming-Lin Liu, 2002). L'ultracentrifugation par gradient de densité (DGUC) permet de séparer les LDL en trois classes : les grosses LDL ou LDL₁ (d=1.025-1.034 g/ml), les LDL de taille et de densité intermédiaires ou LDL₂ (d=1.034-1.044 g/ml) et les LDL de faible densité ou LDL₃ (d=1.044-1.060 g/ml) (Tulenکو et Sumner, 2002).

a- Rôle physiologique des LDL :

Plus généralement, les LDL jouent le rôle un rôle important dans le transport du cholestérol vers les tissus périphériques (Tulenko et Sumner, 2002). Par l'intermédiaire de l'Apo-B100 qui intervient comme ligand des récepteurs-LDL présents dans diverses cellules, les LDL sont internalisées et dégradées dans les lysosomes en vue de la libération du cholestérol libre dans le cytosol.

b- Modifications oxydatives des LDL

L'oxydation des lipoprotéines, particulièrement des LDL, marque l'étape importante du processus de développement de l'athérosclérose. En état d'hyperlipidémie, la teneur élevée des LDL-chol augmente leur susceptibilité à être modifiés par les radicaux libres lors de leur passage à travers la paroi des vaisseaux. Cette oxydation se fait tant au niveau lipidique que protéique.

c- Peroxydation lipidique des LDL :

L'initiation de l'oxydation des lipides par les radicaux libres commence par l'attaque d'une double liaison présente sur un acide gras polyinsaturé. Celle-ci se caractérise par le retrait d'un atome d'hydrogène sur un groupement méthyle (CH_2) et par la formation des diènes conjugués après un réarrangement moléculaire du radical carboné précédemment formé (Young et McEneny, 2001). Les diènes conjugués réagissent très facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxy qui, à son tour, par réaction en chaîne avec d'autres lipides aboutira à la formation des hydroperoxydes lipidiques et de leurs dérivés de dégradation tels que le dialdéhyde malonique (MDA), le 4-hydroxynonanal et

quelques hydrocarbures (éthane, pentane) (Young et McEneny, 2001). Ces aldéhydes, en retour, peuvent se lier aux groupements ϵ -amino lysine de l'Apo-B100 (Palinski et al., 1989), avec pour résultat, une augmentation de la charge négative de la protéine.

d- Oxydation protéique des LDL :

L'oxydation protéique des LDL touche surtout l'Apo-B100 au niveau de laquelle plusieurs résidus peuvent être modifiés par certains pro-oxydants tels que l'acide hypochloreux (OHCl), les chloramines (RNHCl) et les aldéhydes (RHO) libres ou associés aux LDL (Frei et al., 2000). L'OHCl réagit, en effet, facilement avec le groupement ϵ -amino du résidu lysine de l'Apo-B, aboutissant à la formation du N-chloramines. Mais, d'autres résidus acides aminés tels que la cystéine, des résidus méthionine, tryptophane et tyrosine sont aussi susceptibles d'être oxydés par le OHCl.

1.3.2.4 Les lipoprotéines de haute densité (HDL) :

Les HDL sont des lipoprotéines sériques dont la densité est comprise entre 1.063 et 1.21, et dont poids moléculaire varie entre 200 et 400 kDa (Eisenberg, 1984). Celles-ci sont présentes à des teneurs assez élevées dans la circulation (30% des lipoprotéines plasmatique à jeun) lorsque comparées à d'autres types de lipoprotéines telles que les VLDL (15% des protéines plasmatiques à jeun). Ainsi, on les retrouve à des concentrations comprises entre 2 et 6 mM, soit 50 à 200 mg/dl (Kontush et Chapman, 2006). Les précurseurs HDL, encore appelés lipoprotéines discoïdales, prennent naissance à partir des produits de dégradation des VLDL et des chylomicrons

essentiellement composés d'Apo A-I, de cholestérol libre et de phospholipides (Eisenberg, 1984).

a- Métabolisme des lipoprotéines de haute densité :

Les HDL sont formées à partir du pool Apo-A1 qui provient de deux sources principales : des cellules hépatiques qui synthétisent et sécrètent l'Apo-A1, ainsi que de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (Eisenberg, 1984). Ce pool Apo-A1 entre en interaction avec le transporteur de cholestérol ABCA1 (ATP-binding cassette A1) des membranes cellulaires (Zannis et al., 2004) et s'enrichit en phospholipides et en cholestérol. Ce processus aboutit à la formation des précurseurs HDL ou pré- β_1 HDL discoïdaux qui, sous l'action de la LCAT (lecithin : cholesterol acyltransferase) sont progressivement remodelés par estérification du cholestérol libre présent sur leurs membranes (Zannis et al., 2005). Ces derniers passent de pré- β_1 HDL en β_1 HDL, avec une augmentation de volume et une forme de plus en plus sphérique, puis en α_3 HDL (40 Å), en α_2 HDL (60 Å) et enfin en α_1 HDL (130-140 Å).

Les HDL sont donc constituées de deux parties : une partie périphérique qui comprend la membrane essentiellement composée de phospholipides tels que la phosphatidyl-choline (PC), de cholestérol libre, des apoprotéines (Apo-A1, Apo-A2 Apo-C1, Apo-C2, apoC3, Apo-D et Apo-E), de plusieurs autres protéines fonctionnelles telles que la LCAT, la β -glycoprotéine-1, la protéine sérique amyloïde AA (Eisenberg, 1984), la paraoxonase (PON) (Marrugat et al., 2004), ainsi qu'une partie centrale hydrophobe composée essentiellement de cholestérol estérifié et de triglycérides.

b- Rôles physiologiques des HDL :

Quoiqu'encore très discutés, plusieurs rôles sont aujourd'hui attribués aux HDL. En effet, les HDL sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol (Glomset, 1968), dans l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales (Nofer et al., 2001), dans l'inhibition de l'interaction des leucocytes à l'endothélium, dans la protection des cellules endothéliales et enfin dans l'hydrolyse des hydroperoxydes lipidiques au niveau des LDL (Watson et al., 1995). De par ces différentes actions, les HDL participent donc aux mécanismes de défense antioxydant et dans le processus anti-inflammatoire de l'organisme.

1.4. L'athérosclérogénèse :

Les grandes concentrations de LDL oxydées (oxLDL) au niveau des plaques d'athéromes laissent croire à l'implication des LDL dans l'initiation du processus d'athérosclérose (Skalen et al., 2002). En effet, les LDL sont les principaux transporteurs du cholestérol vers les cellules périphériques. Pour cela, elles doivent, dans un premier temps, traverser la paroi des vaisseaux avant de se lier aux récepteurs spécifiques présent sur les cellules et ce, par l'intermédiaire de leur Apo-B100 (Proctor et Mamo, 2003). L'augmentation de la quantité des LDL plasmatiques accroîtrait leur probabilité à pouvoir entrer en interaction avec des radicaux libres dans la paroi artérielle. Comme décrit précédemment, cette interaction aboutit à l'oxydation des constituants lipidiques et protéiques des LDL dont l'apo-B100. Ces LDL oxydées peuvent dès lors jouer un double rôle : d'abord, ils stimulent les cellules endothéliales à sécréter des molécules chémoattractantes telle que le MCP-1 et à exprimer des molécules d'adhésion cellulaire dont les ICAM-1. De ces

différentes expressions, il s'en suit un recrutement des monocytes et leur adhésion à la paroi vasculaire (Mertens et al., 2003; Quinn et al., 1987). Après avoir traversé la barrière endothéliale, ces derniers se différencient en macrophages. Les macrophages ainsi formés possèdent un récepteur qui reconnaît spécifiquement l'apo-B100 modifiée au cours des différents processus d'oxydation des LDL (Endemann et al., 1993). Il s'agit des récepteurs *scavenger* (CD36), qui vont conférer aux macrophages la propriété de lier et surtout, de phagocyter les oxLDL (Kunjathoor et al., 2002).

Dans un second lieu, les oxLDL vont inhiber la migration des macrophages hors de la paroi vasculaire. L'internalisation continue des oxLDL par les macrophages résidents va entraîner leur différenciation en cellules spumeuses (Febbraio et al., 2000) au niveau du sous-endothélium. L'accumulation de ces cellules spumeuses aboutit à un épaissement progressif de la paroi vasculaire (Itabe, 2002) (Figure 1). Dans le même temps, on observe une infiltration des cellules musculaires lisses (SMC) de la media vers l'espace sous-endothélial. Ces SMC vont sécréter une matrice extracellulaire de glucosaminoglycanes et de collagène venant ainsi accélérer l'épaississement du sous-endothélium. Ce processus aboutit à la formation d'un thrombus, ou plaque d'athérome, caractérisé par une occlusion progressive du vaisseau sanguin.

Ainsi, l'athérosclérose pourrait être la conséquence d'une augmentation des systèmes pro-oxydants et/ou d'une diminution des systèmes antioxydants de l'organisme au cours du vieillissement et particulièrement chez les femmes après la ménopause. Les systèmes antioxydants représentent l'ensemble des structures d'origine enzymatique, vitaminique

et moléculaire présentes dans l'organisme et ayant pour rôle d'inhiber, de diminuer et de retarder les effets néfastes, encore appelé stress oxydatif, des radicaux libres à l'égard des tissus.

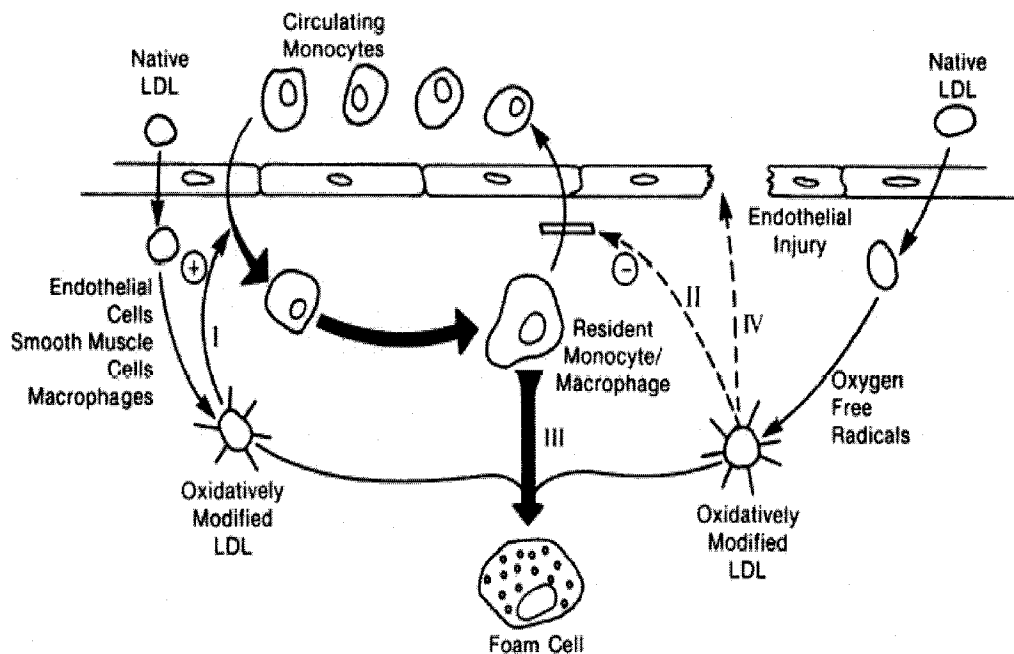


Figure 1 : Initiation de l'athérosclérose (Nathan CF. *J. Clin Invest* 1987).

I : Oxydation des LDL et recrutement des macrophages au niveau du sous-endothélium.

II : Inhibition de la migration des macrophages résidants la lumière vasculaire.

III : Formation des cellules spumeuses après la phagocytose des LDL oxydées.

IV : Rupture de la paroi endothéliale par accumulation excessive des LDL oxydées et des cellules spumeuses.

1.5 Le système pro-oxydant :

Le système pro-oxydant est essentiellement constitué d'un ensemble de molécules hautement réactives désignées sous le terme de radicaux libres. Cette réactivité des radicaux libres, à l'égard des composantes biologiques qu'ils endommagent, provient de la présence d'électrons non appariés au niveau de leurs structures. Les radicaux libres peuvent être de diverses natures. On distingue les métaux de transition, les espèces oxygène-réactives, les espèces nitrogène-réactives et certains enzymes tel que la myéloperoxydase.

1.5.1 Les métaux de transition :

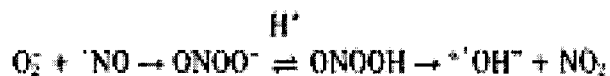
Dans les conditions normales, le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) interviennent, au niveau de l'organisme, comme cofacteurs important pour certaines protéines endogènes tels que les cytochromes et les protéines hémiques aux niveaux desquels ils participent à diverses réactions d'oxydoréduction, et ne sont donc pas présents de manière soluble dans le sang. La céruloplasmine et la transferrine sont les principaux transporteurs plasmatiques du Cu^{2+} et du Fe^{2+} respectivement (Halliwell et Gutteridge, 1990). Pourtant, des études ont montré la présence des ions Fe^{2+} et Cu^{2+} dans des lésions athérosclérotiques (Swain & Gutteridge, 1995) et qu'ils semblent, à ce niveau, intervenir activement dans le processus d'oxydation des LDL (Leake et al., 1995) en se liant directement à ces dernières.

1.5.2 Espèces oxygène réactives:

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont largement produites dans les systèmes biologiques. Les plus abondants sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). L'anion superoxyde est généralement produit au cours du processus de respiration cellulaire au niveau du complexe des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il peut aussi être le produit d'oxydation de diverses enzymes telles que la xanthine oxydase, la FADH2 oxydase, la P450 oxydase ou encore du cytochrome b5 (Mates et al., 1999). Le radical hydroxyle résulte de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les métaux de transitions dont le Fe^{2+} et le Cu^+ .

1.5.3 Espèces nitrogènes réactives

Les espèces réactives de l'azote représentent l'ensemble des molécules réactives contenant le groupement NO- dans leur structure et dont le peroxynitrite ($ONOO^-$) est le plus abondant. L' $ONOO^-$ est issu de la condensation du NO^{\cdot} , l'un des plus puissants vasodilatateurs sécrétés par les cellules endothéliales, et de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (Landmesser et Harrison, 2001). Le peroxynitrite, très instable, se décompose très rapidement en radical hydroxyle ($\cdot OH$) et en dioxynitrite ($\cdot NO_2$) selon la réaction :



Le potentiel cytotoxique du $ONOO^-$ vient du fait qu'il peut entraîner l'oxydation des groupements sulfidryls des cystéines et des glutathions aboutissant ainsi à une déplétion des mécanismes de défense intra- et extracellulaires contre les dommages radicalaires engendrés par ses intermédiaires ($\cdot OH$ et NO_2) (Radi et al., 1991), de même qu'une

perturbation des voies métaboliques et fonctions membranaires essentielles aux processus de biosynthèse.

Des études en laboratoire ont montré, d'une part, que la modification oxydative des LDL par le peroxynitrite augmente leur susceptibilité à être incorporées par les macrophages (Graham et al., 1993). D'autre part, le peroxynitrite entraînerait une oxydation de l' α -tocophérol en α -tocophéryl quinone au cours du processus d'oxydation des LDL, suggérant ainsi une consommation d'antioxydants endogènes et une production de radicaux libres tels que le radical α -tocophéroxyl.

1.5.4 La myéloperoxydase :

La myéloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine synthétisée au stade promyélocytaire et sécrétée par les macrophages (Winterbourn et al., 2000). Il s'agit d'une molécule tétramérique composée de deux dimères identiques contenant chacune un groupement prosthétique d'hème.

La MPO peut contribuer de diverses façons à la modification oxydative des LDL. Dans un premier temps, lorsque sécrétée par les macrophages au niveau du sous-endothélium, la MPO peut réagir avec le H_2O_2 et former un complexe qui, à son tour, va oxyder l'ion Cl^- en vue de la formation de l'acide hypochlorique (OHCl) (Carr et al., 2000). Des études *in vitro* ont montré que l'incubation des LDL en présence d'acide hypochlorique entraînait une diminution des différents antioxydants tels que l' α -tocophérol (α -TOH), l'ubiquinol-10 et les β -carotènes qui entrent dans la constitution des différents systèmes de défenses antioxydants des LDL (Hazell et Stocker, 1993). L'OHCl provoquerait d'autre part une modification du résidu ϵ -amino-lysine de l'Apo-B100, se traduisant aussi

par une augmentation de la charge négative nette à la surface des LDL (Haberland et al., 1984). Ces différentes modifications de l'Apo-B100, auxquelles peuvent s'ajouter une perte des résidus tryptophanes et cystéines, aboutit à la reconnaissance spécifique de cette apoprotéine par les récepteurs *scavenger* des macrophages activés au niveau du sous-endothélium des parois vasculaires.

En somme, le système pro-oxydant se compose d'un ensemble de molécules qui, dans des conditions physiologiques normales contribuent au maintien des différentes voies métaboliques de l'organisme en agissant soit, comme cofacteurs, soit comme molécules impliquées dans la défense immunitaire, ou encore comme intermédiaires métaboliques de la respiration cellulaire. Dans des conditions pathologiques par contre, ou au cours du vieillissement, ces dernières peuvent être produites de façon excessive et ainsi contribuer, de par leur haut niveau de réactivité, à la déstabilisation des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Cette effet, encore connu sous le nom de stress oxydatif résulte en partie d'une altération des différents systèmes de défense antioxydants.

1.6 Le système antioxydant :

Le système antioxydant (AO) se divise en trois parties dont, les AO actifs de nature enzymatique, les AO passifs sous forme de cofacteurs et de certaines molécules vitaminiques. Il s'agit d'un ensemble de composés biologiques ayant pour fonction globale d'inhiber les effets délétères causés par les radicaux libres dans l'organisme, soit en réagissant directement avec ces dernières, soit en entraînant la dégradation d'une grande part des produits d'oxydation des lipides et des protéines

1.6.1 Le système antioxydant actif :

Trois enzymes en particulier ont essentiellement un rôle antioxydant. Il s'agit du superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la catalase.

1.6.1.1 Le superoxyde dismutase (SOD):

Il existe trois (3) formes de SOD chez l'humain selon qu'elles contiennent du fer, du cuivre ou du manganèse au niveau de leurs sites actifs. Il s'agit du Cu/Zn-SOD cytosolique, du Mn-SOD mitochondrial et du SOD extracellulaire (EC-SOD) (Sandstrom et al., 1994). Le Cu/Zn-SOD (SOD-1) est constitué de deux (2) sous-unités de 32 kDa chacune contenant un atome de cuivre et un atome de zinc liés par un résidu histamine, tandis que le Mn-SOD est un homotétramère de 96 kDa contenant un atome de manganèse par sous-unité qui, cycliquement, passe de la forme Mn (III) à Mn (II) et inversement durant les deux étapes de la dismutation de l'anion superoxyde (MacMillan-Crow et al., 1998). Très abondant au niveau des mitochondries (Harrison et al., 2002), des études menées chez les souris knock-out ont montré qu'une déficience en Mn-SOD entraîne certaines cardiopathies, une accumulation de lipides dans le foie et les muscles squelettiques, et une acidose métabolique aboutissant généralement à un décès chez la souris nouveau-née au bout d'une dizaine de jours (Li et al., 1995). Enfin, l'EC-SOD est une glycoprotéine sécrétoire possédant un atome de cuivre et de zinc dans sa structure. Il est essentiellement présent dans l'espace interstitiel, ainsi que dans différents fluides extracellulaires (Marklund, 1984).

La SOD est l'enzyme dont le rôle antioxydant provient de sa capacité à catalyser la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, hautement réactive, en O_2 et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle intervient ainsi dans les premières lignes de défense antioxydante. De part cette action sur l'anion superoxyde, elle empêche la réaction de ce dernier avec le NO^{\cdot} et de ce fait, inhibe la formation du peroxynitrite hautement oxydant. En prévenant la dégradation de NO^o , elle permet le maintien normal de son action vasorelaxante et anti-thrombotique (Radi et al., 1991).

1.6.1.2 La glutathione peroxydase :

La selenoenzyme glutathione peroxydase (GPX) est présente, de manière ubiquitaire, dans l'organisme des mammifères, notamment chez l'humain. Elle intervient dans la réduction et la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de divers hydroperoxydes en utilisant le GSH comme substrat, protégeant ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs (Mates et al., 1999). On distingue cinq (5) types d'isoenzymes GPX dont la nomenclature est fonction de leur localisation ou des substrats sur lesquels elles semblent agir préférentiellement. Les plus importantes sont la glutathione peroxydase cytosolique et mitochondrial et la glutathione peroxydase phospholipide hydroperoxyde.

La glutathione peroxydase cellulaire se répartit à 92-95% au niveau du cytosol et à 5-8% au niveau mitochondrial. La GPX1 mitochondriale intervient essentiellement dans la protection de la membrane interne contre les dommages oxydatifs et semble ainsi inhiber la dénaturation du cytochrome P-450 et de la succinate déshydrogénase, deux enzymes

essentielles au processus de respiration cellulaire (Kimura et al. 1985). De manière complémentaire, la GPX1 cytosolique intervient dans la protection de la membrane externe mitochondriale. Cette action est particulièrement régie par sa capacité à éliminer les H_2O_2 et certains acides gras cytosoliques (Thomas et al., 1990).

1.6.1.3 La Catalase :

La catalase (CAT) est une enzyme tétramérique de 240 kDa constituée de quatre (4) sous-unités de 60 kDa chacune, contenant un groupement ferriprotoporphyrine (Mates et al., 1999). Elle intervient préférentiellement, chez les mammifères, dans les réactions de détoxification en éliminant très efficacement le H_2O_2 pour former une molécule d'eau et l'oxygène. Le H_2O_2 , produit par les cellules, est potentiellement générateur de radicaux libres et peut, de ce fait, induire la réaction de stress oxydatif au niveau cellulaire. Ainsi, la catalase interviendrait dans l'acquisition de la tolérance au stress oxydatif lors de la réponse adaptative des cellules (Mates et al., 1999).

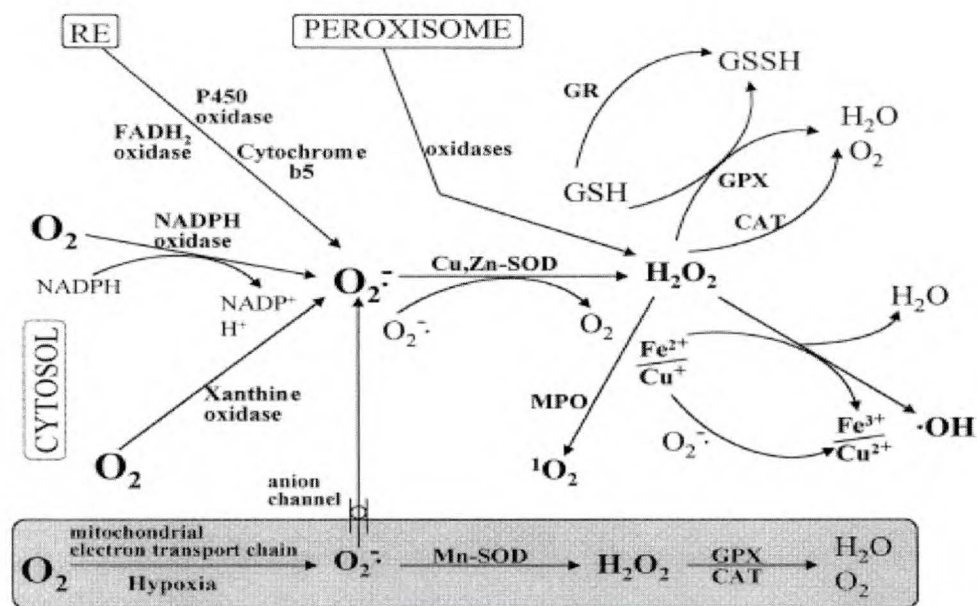


Figure 2 : Interaction entre les différents systèmes pro-oxydants et antioxydants.
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: anion superoxyde; $\cdot\text{OH}$: radical hydroxyle; Cu,Zn-SOD : superoxyde dismutase;
 GPX : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; CAT : catalase; MPO :
 myélopéroxydase; GSSH : glutathion dissulfide; GSH : glutathion réduit
 (Matés et al., 1999).

1.6.2 Le système antioxydant passif.

Le système antioxydant passif est essentiellement composé d'activateurs métaboliques d'origine plasmique et cellulaire. On distingue l' α -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et l'ubiquinol-10.

1.6.2.1 L' α -tocophérol :

L' α -tocophérol (α -TOH) fait partie d'un ensemble de molécules biologiques ayant toutes une homologie structurale connue sous le nom de vitamine E. On distingue deux classes de vitamine E dont les tocophérols et les tocotrienols. Il existe quatre tocophérols constitués d'un noyau chromanol auquel est reliée une chaîne saturée de 16 carbones. Ce noyau possède différentes substitutions de groupement méthyl au niveau des carbones en position 5, 7 et 8, ce qui permet de les distinguer en α -, β -, δ - et γ -tocophérol. Cette différenciation est semblable pour les tocotrienols, mais ces derniers se distinguent des tocophérols par la présence d'une chaîne polyinsaturée isoprénoïde de 16 carbones. Ces insaturations apparaissent en position 3', 7' et 11' (Schneider, 2005). Bien que tous semblent avoir des propriétés anti-oxydantes, l' α -tocophérol représente la forme la plus réactive.

Généralement présent à l'intérieur des LDL à cause de son caractère hydrophobe, l' α -tocophérol intervient comme antioxydant endogène en arrêtant la phase de propagation de la peroxydation des lipides de la membrane des LDL (Khalil, 2002). Au cours de cette phase, il y a une formation du radical α -tocophéroxyl (α -TO $^\circ$) (Kontush et al., 1996) qui à son tour peut avoir des propriétés pro-oxydantes à l'égard des LDL (Stocker et al., 1992).

Des études menées *in vitro* ont montré que l' α -TOH pouvait prévenir, par diverses autres manières, le processus d'athérogénèse. En effet, l' α -TOH semble inhiber l'adhésion endothéliale des monocytes en diminuant de façon significative l'expression des molécules d'adhésion cellulaire tel que l'ICAM-1 et de certains médiateurs chimiques, à l'exemple du MCP-1, de l'IL-8 et de l'IL-6, par les cellules endothéliales (Wu et al., 1999). D'autre part, l' α -TOH préserverait la fonction vasomotrice des parois endothéliales, puisque la faible concentration de l' α -TOH, chez des patients à risque de MCV, est positivement corrélée à une perte de la vasodilatation des parois artérielles (Kinlay et al., 1999).

1.6.2.2 L'acide ascorbique :

La vitamine C, encore appelée acide ascorbique, est une cétolactone de poids moléculaire de 176.1 kDa qui, chez l'humain, est exclusivement d'origine alimentaire, ce dernier ne possédant pas l'enzyme gulonolactone oxydase chargée de transformer le L-gulonolactone en 2-céto-gulonolactone (Masella et al., 2005). La vitamine C intervient dans plusieurs réactions métaboliques, particulièrement dans la régénération de la vitamine E en intervenant comme accepteur d'électrons du radical tocophéryl au niveau de la membrane des LDL (Frei et al., 2000). Ce radical pro-oxydant peut, à son tour, être reconverti en ascorbate en transférant ses électrons au système GSH/GSSH et NADPH/NAD (Levinson et al., 2004) (Figure 4).

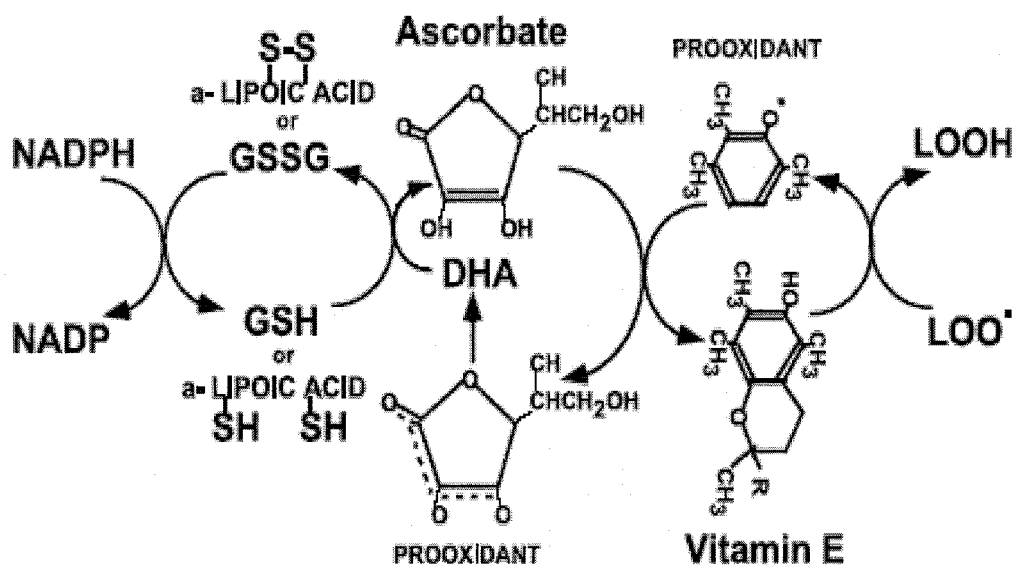


Figure 3 : Régénération de l' α -tocophérol par l'acide ascorbique.
 LOO \cdot : Lipides oxydés; DHA : dihydroxyascorbate; GSSG : glutathion dissulfide; GSH : glutathion réduct

1.6.2.3 L'ubiquinol-10

L'ubiquinol-10 ou coenzyme Q10 est l'antioxydant endogène des LDL qui intervient durant la phase précoce de la peroxydation lipidique (Stocker et al., 1991). Particulièrement présent au niveau de la bicouche lipidique des mitochondries, il intervient, d'une part, dans l'arrêt de la phase d'initiation de l'oxydation des lipides en réagissant comme accepteur d'électrons des métaux de transition. D'autre part, il inhibe aussi la phase de propagation en entraînant activement la régénération de l' α -TOH par sa réaction avec le radical α -tocophéryl. L'ubiquinol-10 est régénéré par le système NAD(P)/NADPH faisant intervenir l'enzyme DT diaphorase.

En résumé, les systèmes antioxydants sont constitués d'un ensemble de composés biologiques qui ont tous pour rôle ultime de bloquer l'oxydation des membranes en agissant comme accepteurs d'électrons monovalents des espèces réactives d'origine enzymatique ou résultant de certains déséquilibres métaboliques. Hormis ces différents systèmes, certaines lipoprotéines, telles que les HDL, interviennent pour une grande part dans la prévention et les mécanismes de défense contre le stress oxydatif.

1.7 Rôle des HDL dans l'efflux du cholestérol et l'hydrolyse des lipides oxydés :

Les HDL interviennent primordialement dans le transport inverse du cholestérol (Glomset, 1968). Il s'agit du mécanisme par lequel les HDL retirent le cholestérol en excès des cellules et le transportent vers le foie, à travers la lymphe puis le sang, pour qu'il soit éliminé dans la bile ou recyclé (Kellner-Weibel et al., 2002). Sensiblement 9 mg de cholestérol par kg de poids corporel synthétisé par les tissus périphériques chaque

jour est reconduit vers le foie pour y être catabolisé (Nofer J-R, 2002). Initialement, les pré- β_1 -HDL se fixent, par l'intermédiaire de leur Apo-A1, aux récepteurs membranaire SR-BI (scavenger receptor B1) des cellules et interagissent avec l'ABCA1 qui forme un canal permettant le transfert du cholestérol des cellules vers les HDL naissantes (Chroni et al., 2004; Oram et al., 2004). Les HDL préviennent ainsi l'accumulation du cholestérol au niveau intracellulaire et réduisent leur susceptibilité à l'oxydation (Figure 4).

L'importance de l'efflux du cholestérol est surtout observée au niveau des parois vasculaires où, plusieurs hypothèses suggèrent en effet qu'en retirant le cholestérol des LDL et des macrophages au niveau du sous-endothélium vasculaire, les HDL préviendraient l'initiation de l'oxydation des LDL par les radicaux libres (Nofer, 2002). D'autre part, les HDL interviendraient directement dans la diminution de l'oxydation en hydrolysant les phospholipides polyinsaturés hydroperoxydes (qui sont les plus susceptibles à l'oxydation) déjà présents sur les oxLDL (Durrington et al., 2001; Mackness et al., 1998). De par ces deux actions, les HDL préviennent ainsi l'activation des cellules endothéliales, le recrutement des monocytes et ainsi, leur accumulation au niveau de la paroi vasculaire.

Ces différentes propriétés ont de plus en plus été attribuées à la paraoxonase 1 présente au niveau de la membrane des HDL. Diverses études tendent à montrer, en effet, que la réduction de l'activité de la paraoxonase 1 serait inversement corrélée avec la survenue de l'athérosclérose (McElveen et al., 1986). Chez les mammifères, trois (3) types de paraoxonases ont été identifiées. Il s'agit de la paraoxonase 1 (PON1), la paraoxonase 2

(PON2) et de la paraoxonase 3 (PON3) dont les gènes sont localisés de façon adjacente sur le chromosome 7 chez l'humain (Aviram et Rosenblat, 2005).

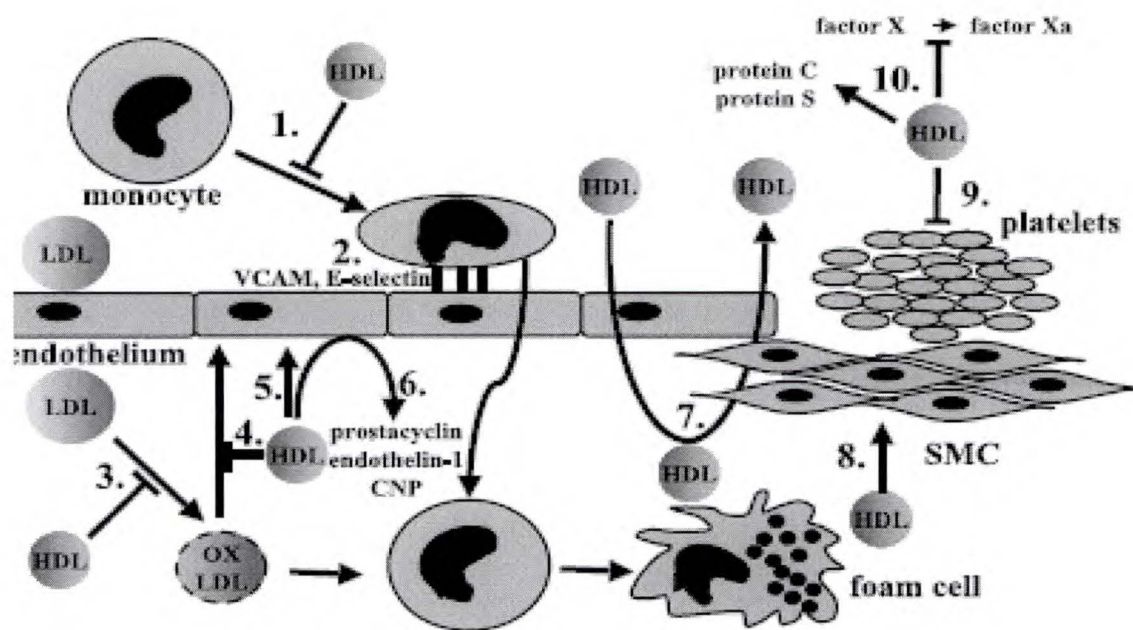


Figure 4: Rôles potentiels des HDL dans l'inhibition des l'athérosclérogénèse.
 SMC : cellule musculaire lisse; OxLDL : LDL oxydé; VCAM : Molécule d'adhésion cellulaire
 (Nofer et al., 2002)

1.7.1 La paraoxonase 1 :

La PON1 est une glycoprotéine Ca^{2+} -dépendante, fortement associée aux HDL, de poids moléculaire variant entre 43 et 45 kDa et qui contient dans sa structure trois (3) chaînes d'hydrates de carbone comptant pour 15.8% de son poids. Principalement identifiée chez les mammifères, la présence de la PON1 chez l'humain lui confère une certaine protection contre une exposition chronique, à de faibles concentrations, de pesticides organophosphates, car en effet, la PON1 a la propriété d'hydrolyser des métabolites de certains insecticides tels que le parathion ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{PS}$), le diazinon ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$) ou le chlorpyrifos-éthyle (Draganov et La Du, 2004).

Diverses études suggèrent que la PON1 pourrait également être la protéine essentielle qui conférerait aux HDL leurs propriétés antioxydantes. Aviram et ses collaborateurs (Aviram et al., 2002) ont d'ailleurs noté une augmentation de l'oxydation des LDL et de celle des macrophages chez les souris transgéniques pour la PON1 (PON1^0). Dans le même sens, il a été montré que les HDL, incubés avec les oxLDL, diminuaient considérablement les phospholipides oxydés présent sur leurs membranes (Watson et al., 1995) et que cet effet était consécutif à une hydrolyse de ces phospholipides par la PON1. L'augmentation de l'efficacité des HDL, dans l'efflux du cholestérol et sa capacité anti-inflammatoire, passe en grande partie par l'intégrité métabolique et fonctionnelle de la PON1. Toute mesure qui va tendre à entretenir ou à améliorer le fonctionnement de cette enzyme, surtout au cours du vieillissement, pourrait en grande partie contribuer à la prévention des risques d'athérosclérose et de toutes les complications cardiovasculaires qui en découlent.

1.8 La leptine :

La Leptine est une hormone protéique de 167 acides aminés (16 kDa) qui est le produit d'expression du gène *ob*. Au simple rôle de régulateur d'appétit qui lui est attribué lors de sa découverte, son influence dans divers processus métaboliques vient s'ajouter au fil des années.

1.8.1 Physiologie de la leptine :

De nombreuses études, initialement effectuées dans le modèle animal (rat et souris), ont d'abord décrit la leptine comme un facteur de satiété (Komatsu et al., 2006). À ce rôle s'ajoute celui de régulateur majeur du gras et de l'homéostasie énergétique chez les mammifères (Loskutoff et al., 2001). En effet, la leptine voit son excrétion augmenter, par les adipocytes, lors d'une mise en réserve excessive de triglycérides. Une fois dans la circulation, la leptine traverse la barrière hématoencéphalique et se lie à son récepteur spécifique au niveau de l'hypothalamus, où elle active la voie de JAK (Janus-activated kinase) et STAT (signal transducers and activator of transcription), impliquées dans la transduction du signal intracellulaire (Chehab, 2000). Il s'ensuit une désensibilisation des neurones spécifiques du noyau arqué, en vue de diminuer la sécrétion du neuropeptide Y (NPY). Ceci aboutit à une augmentation de la sensation de satiété et une activation du système nerveux sympathique qui contrôle les phénomènes de lipolyse au niveau du tissu adipeux blanc.

1.8.2 Rôle de la leptine dans l'athérosclérogénèse :

En plus de son implication dans le métabolisme lipidique, plusieurs effets athérogéniques lui ont également été attribués. D'abord, la leptine semble stimuler la production endothéliale de l'endothéline-1 (ET-1) pro-athérosclérotique (Quehenberger et al., 2002). L'ET-1 est le principal vasoconstricteur sécrété par les cellules endothéliales. Son effet direct sur le calibre des vaisseaux pourrait expliquer en partie l'hypertension artérielle (HTA) observée chez les personnes obèses et de ce fait, une forte susceptibilité à l'athérosclérose. De plus, la leptine est impliquée dans la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses au niveau des parois vasculaires (Yokoyama et al., 2001). Et cela serait consécutif à sa fixation au niveau de la forme active et courte du récepteur Ob-R présente au niveau de ces cellules. L'Ob-R a d'ailleurs été fortement identifié dans les plaques athérosclérotiques, notamment au niveau des cellules spumeuses, des cellules endothéliales néoformées et au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (Kang et al., 2000).

Or, des études montrent que les personnes obèses présentent généralement des taux de leptine plasmatique élevés (Considine et al., 1996) lorsque comparés aux non obèses. Il existerait en effet une corrélation positive entre la concentration de leptine circulante et le pourcentage de gras corporel. L'une des principales explications à cette teneur élevée serait une tendance qu'ont les personnes obèses à développer une certaine résistance à la leptine (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000). Même si les mécanismes qui régissent cette résistance à la leptine ne semblent pas totalement élucidés, plusieurs hypothèses sont néanmoins avancées. Celles-ci suggèrent soit un défaut dans le transport

de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique par saturation de son transporteur spécifique suite à une teneur élevée de la leptine plasmatique (Caro et al., 1996) ou encore que la leptine induirait l'expression d'un suppresseur de la voie de signalisation des cytokines, précisément le SOCS-3, par rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus (Flier et al., 1998).

En somme, la leptine peut se montrer comme un marqueur non négligeable du risque de MCV chez les femmes postménopausées et obèses de par ses effets directs sur la vasoconstriction et l'épaississement de la paroi endothéliale par leur capacité à stimuler la migration des cellules musculaires lisses au niveau du sous-endothélium.

1.9 Traitement des complications liées à l'obésité :

Divers types de traitements peuvent être envisagés à titre préventif ou curatif. Même si le maintien d'une bonne hygiène de vie représente le meilleur moyen de prévenir les risques des MCV, les bouleversements physiologiques liés à la ménopause ont souvent amené les femmes post-ménopausées à utiliser des œstrogènes de substitution.

1.9.1 Effet des hormones de substitution (THS) sur l'incidence des MCV chez les femmes postménopausées et obèses :

Pour pallier aux symptômes de la ménopause, les femmes ont souvent recours aux œstrogènes de substitution. Plusieurs études prospectives ont également montré que, hormis le soulagement des symptômes de la ménopause, les œstrogènes de synthèse (THS) diminuaient significativement les risques d'évènements coronariens. Par exemple,

une étude de Grodstein et ses collaborateurs a suivi 70 553 femmes prenant des œstrogènes conjugués à la progestine de 1976 à 1996 et âgées entre 30 et 55 ans pour des infarctus du myocarde, des attaques cardiaques et des événements coronariens majeurs (Grodstein et al., 2000). Cette étude a montré que le risque d'évènement coronarien majeur était significativement réduit parmi celles qui utilisaient les œstrogènes, même à court terme, lorsque comparé à celles qui n'en ont jamais pris.

Une étude menée en 1996 par Bender et ses collaborateurs avait pour objectif de tester l'effet des hormones de synthèse et de l'exercice physique seul et en combinaison sur les profils lipidique et lipoprotéique chez 72 femmes postménopausées âgées entre 60 et 72 ans. Après 11 mois de suivi, il y avait une diminution du cholestérol total ($p < 0.01$) et de LDL-cholestérol ($p < 0.05$) dans le groupe exercice, une diminution des LDL-cholestérol, une augmentation des HDL-cholestérol ($p < 0.05$) et de triglycérides ($p < 0.01$) dans le groupe THS et enfin, dans le groupe auquel on avait administré le THS associé à l'exercice on observait une diminution significative du cholestérol total, des LDL-cholestérol et une augmentation du HDL-cholestérol. Cette étude a non seulement permis de montrer l'effet indépendant de l'exercice et du THS mais surtout, elle a mis en évidence leurs effets synergiques.

Cependant, cet effet bénéfique des œstrogènes de substitution à l'égard des risques des MCV semble aujourd'hui de plus en plus discuté, d'autant plus que diverses études ont associé les œstrogènes de synthèse à divers effets secondaires suite à leur utilisation à long terme. Une méta-analyse de Beral et al. (1997) permettant de regrouper 51 études

épidémiologiques d'Europe et d'Amérique du Nord a montré que les femmes voyaient leur risque de cancer du sein augmenter de 2.3% par année lorsqu'elle étaient soumises aux hormones de remplacement, alors que l'incidence de cancer diminue normalement de manière progressive au cours de la postménopause (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Une étude de Rossouw et ses collaborateurs ayant suivi 16 603 femmes (50-79 ans) aux États-Unis a même montré que le taux de maladies cardiaques augmentait d'environ 29% chez les femmes prenant de l'œstrogène, avec 41% d'augmentation d'attaques cardiaques et un taux de thromboses veineuses deux fois supérieur lorsque comparé au groupe placebo (Rossouw et al., 2002). La conclusion globale des ces études est que les œstrogènes n'avaient aucun bénéfice quant à la prévention des MCV et de ce fait, ne doivent pas être administrés en premier choix pour prévenir les risques de maladies cardiaques.

Compte tenu de ces conclusions et surtout de la mise en évidence de l'augmentation des MCV, diverses études tentent de montrer que les œstrogènes naturels, notamment les phytoestrogènes, seraient une alternative intéressante à l'hormonothérapie de synthèse.

1.9.2 Les phytoestrogènes :

Les phytoestrogènes sont des substances contenues dans certaines plantes dans lesquelles ils interviennent comme fongicides naturels, ou encore protègent contre le rayonnement ultraviolet et peuvent servir comme pigment pour certaines fleurs. Ils ont la particularité d'avoir une homologie structurale et fonctionnelle comparables au 17- β -œstradiol et, de ce fait, sont capables de produire des effets estrogéniques relativement similaires en se fixant sur les récepteurs d'œstrogènes (Setchell et Cassidy, 1999). Les phytoestrogènes peuvent être classés en trois (3) catégories : Les isoflavones, les coumestrans et les lignans (Dixon, 2004).

On distingue quatre types (4) d'isoflavones : la génistéine, le daidzéine, (la glycitéine) la formononetine et la biochanine A, très souvent contenus dans les plantes sous leur forme glycosylée (Dixon, 2004). Les isoflavones peuvent être trouvés dans le tofu, les luzernes, les noix, la bière, le thé et le café, mais très abondamment dans les grains de soja (de Kleijn et al., 2001). Le coumestrol représente le coumestan le plus important. On le retrouve principalement dans les luzernes et le brocoli tandis que les lignans sont concentrés dans les grains de café et de lin. On distingue deux (2) types de lignans : le secoïsolariciresinol-digluconide (SECO-DG) et le mataïrésinol (MAT) (Thompson et al, 1997).

1.9.2.1 Métabolisme des phytoestrogènes :

La biotransformation des phytoestrogènes par la flore intestinale influence significativement leur activité biologique, leur biodisponibilité et par conséquent, leurs effets physiologiques.

a- Métabolisme des isoflavones :

Les isoflavones et les lignans empruntent relativement la même voie métabolique. En effet, lors de l'apport alimentaire de la génistine, de la daidzine et de la glycitine, les glucosidases, produites par les bactéries intestinales, catabolisent les résidus sucrés qui les constituent. Cette réaction aboutit à la formation des formes aglycones de ces isoflavones, notamment la génistéine, la daidzéine et la glycitéine, qui sont, en partie absorbées au niveau le tractus intestinal (Kurzer et al., 2003). D'autre part, la génistéine et la daidzéine peuvent également être transformées en d'autres intermédiaires métaboliques dont le p-éthyl phénol et l'O-desméthylangolensine (O-DMA) respectivement. Ces derniers, ayant un potentiel estrogénique plus élevé que leurs précurseurs, subissent à leur tour une absorption. Après ce passage intestinal, les isoflavones sont soumis à une conjugaison hépatique au cours de laquelle l'acide glucuronique ou le sulfate leurs sont greffés (Setchell et Cassidy, 1999) avant de les voir agir sur leurs récepteurs au niveau des organes cibles.

Dans le même sens, les lignans sont également métabolisés par les bactéries de la flore intestinale. Le SECO-DG, sous l'action des glucosidases, est transformé en secoïolariciresinol (SECO). Puis ce dernier, par une suite de réactions successives de

déméthylations et déshydroxylations est converti en entérodiol. L'entérodiol peut soit être absorbé directement, soit être irréversiblement oxydé, en même temps que le MAT, en entérolactone (*trans-2,3-bis[(3-OH-phenyl)méthyl]butyrolactone*) toujours par les bactéries intestinales (Setchell et Cassidy, 1999).

1.9.2.2 Intérêt clinique des phytoestrogènes :

Diverses études épidémiologiques ont montré que les phytoestrogènes sont associés à une diminution significative des symptômes de la ménopause. En effet, 70 à 80% de femmes en Europe et en Amérique présentent des bouffées de chaleur après la ménopause contre 57% en Malaisie et 18 à 25% seulement en Chine et au Japon (Sturdee, 1997; Gilbert et al., 1988). Cette différence s'explique de plus en plus par la richesse en phytoestrogènes du régime alimentaire de base des femmes asiatiques (Marc et al., 2003). Dans le même sens, des résultats d'essais randomisés à double insu, au cours desquels des extraits de soja étaient administrés aux femmes post ménopausées, ont démontré une baisse significative de la fréquence des bouffées de chaleurs, ainsi que de leur intensité, lorsque comparé au groupe placebo (Albertazzi et al., 1998).

1.9.2.3 Phytoestrogènes et maladies cardiovasculaires :

En plus de leurs effets sur les symptômes de la ménopause, les phytoestrogènes, particulièrement les isoflavones, semblent diminuer le risque de maladies cardiovasculaires. Certaines études randomisées menées chez des femmes postménopausées et normolipidémiques, ont montré des effets positifs, quoique modestes, des phytoestrogènes sur les niveaux plasmatiques des HDL-cholestérol , LDL-

cholestérol (Kurzer et al., 2000) et des triglycérides (Yamori et al., 2002). Comme l'indiquent Yamori et ses collaborateurs, les phytoestrogènes induiraient cette diminution des LDL circulant en augmentant l'expression des récepteurs-LDL au niveau cellulaire. Dans le même sens, des effets hypocholestérolémiantes des œstrogènes naturels ont également été observés chez les singes et les hamsters où des réductions significatives du cholestérol plasmatique total de l'ordre de 46% et 58%, respectivement, (Nicolosi et al., 1998) ont été obtenues après une diète riche en phytoestrogènes pendant huit (8) semaines.

Chez des guenons ovariectomisées et préalablement soumises à un régime athérogène, un régime riche en phytoestrogènes ou en oestrogènes conjugués administré pendant une période de 36 mois entraîne une réduction équivalente et significative des concentrations de cholestérol total et de cholestérol-LDL. Une inhibition de la progression de l'athérosclérose iliaque et une réduction des lésions coronariennes et des carotides internes ont été observées (Anthony, 2000; Clarkson et al., 2001). Par ailleurs, une méta-analyse résumant 29 des 38 études cliniques publiées confirme une association entre la consommation de protéines de soja et l'amélioration du profil lipidique (Anderson, Johnstone, & Cook-Newell, 1995b). Une consommation moyenne de 47 g de protéines de soja par jour entraîne une réduction significative du cholestérol total de 9,3 %, une diminution du cholestérol-LDL de 12,9 % et une légère élévation (non significative) du cholestérol-HDL. Cependant, ces études incluaient des hommes et des femmes pré- ou ménopausées et normo- ou hypercholestérolémiques. Depuis, plusieurs essais cliniques randomisés ont été menés spécifiquement avec des femmes ménopausées normo - et

hypercholestérolémiques. Les résultats des quatorze essais cliniques réalisés sur une période allant de 4 à 24 semaines, publiés depuis 1997, ne sont pas tous concordants (Kronenberg & Fugh-Berman, 2002). La population étudiée, la durée des essais cliniques et, surtout, les différences dans les types de produits utilisés (produits dérivés du soja, graines de lin ou extraits d'isoflavones ou de trèfle rouge) rendent, encore une fois, la comparaison de ces résultats difficile (Kronenberg & Fugh-Berman, 2002; Warren et al., 2002). Les conclusions de sept des huit articles ayant évalué l'effet sur le bilan lipidique des protéines de soja complètes ou de graines de lin broyées confirment ceux que l'on trouve dans la méta-analyse d'Anderson *et al.* (Anderson et al., 1995a) et confirment un effet favorable de la consommation de protéines de soja ou de graines de lin broyées sur les niveaux de cholestérol total et de cholestérol-LDL. En revanche, aucun des six essais cliniques étudiant l'efficacité des extraits d'isoflavones ou de trèfle rouge ne mentionne une diminution significative du bilan lipidique, comparativement aux placebos. Ces résultats suggèrent que les protéines de soja intactes affecteraient plus favorablement le bilan lipidique que les extraits d'isoflavones obtenus par le procédé d'extraction alcoolique. Lucas *et al.* (Lucas et al., 2002), dont la recherche s'étend sur 3 mois, rapportent chez 48 femmes ménopausées une diminution de 7,5 % des apolipoprotéines B et de 6 % des apoprotéines A1, après la prise d'un supplément de 40 g de graines de lin broyées. Lemay *et al.* (Lemay et al., 2002), de leur côté, n'observent aucune diminution significative, sur 2 mois, de l'apoprotéine B, après la prise de 40 g de graines de lin broyées, en comparaison avec le traitement hormonal substitutif.

Ainsi, la littérature suggèrent un effet bénéfique des phytoestrogènes sur les symptômes vasomoteurs, la masse osseuse et le profil lipidique des femmes ménopausées en bonne santé, surtout lorsqu'ils sont consommés en grande quantité et sur une longue période. De Kleijn *et al.* (de Kleijn et al., 2001) ainsi que Setchell *et al.* (Setchell et al., 2003). recommandent de prescrire 75 mg d'isoflavone par jour si on désire obtenir des effets tant sur le métabolisme osseux que sur le cholestérol. Par ailleurs, en complément à ces informations, Kronenberg *et al.* (Kronenberg & Fugh-Berman, 2002), de même que Hale *et al.* (Hale et al., 2002), préconisent des traitements plus longs que 6 mois. L'effet est cependant moindre que celui observé avec le traitement hormonal substitutif, vraisemblablement en raison d'une grande variabilité individuelle dans l'absorption intestinale.

Enfin, les phytohormones, particulièrement les isoflavones, influenceraient positivement la résistance des LDL à l'oxydation, ce qui est caractérisé par l'augmentation du temps de latence de l'oxydation des LDL lorsque ces dernières sont incubées en présence des ions Cu^{2+} et des phytoestrogènes (Ruiz-Larrea et al., 1997).

1.9.2.4 Phytoestrogènes et cancers :

Diverses études suggèrent que les phytoestrogènes semblent jouer un rôle important dans la protection contre plusieurs cancers et ce, de par la faible incidence de cancer observée chez les personnes ayant une alimentation riche en isoflavones. Ces propriétés viendraient de leur capacité à influencer non seulement la biodisponibilité des hormones

sexuelles circulantes mais également par leur propriété à moduler l'activité de certaines enzymes qui interviennent dans le métabolisme de ces hormones.

Adamski et ses collaborateurs (2002) ont, par exemple, montré *in vitro* que les phytoestrogènes diminuaient significativement l'activité de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 5 (17 β -HSD 5) en se fixant sur le site de liaison hydrophile de certains cofacteurs (Adamski et al., 2002). Cette enzyme, de la famille des aldo-céto réductases, est essentielle à la formation ou à l'inactivation des hormones stéroïdes actives par l'oxydation ou la réduction de ces hormones à la position 17 et inhiberait ainsi leur effet carcinogène. Dans le même sens, les phytoestrogènes semblent également inhiber l'aromatase en se fixant au niveau de son site catalytique (Adlercreutz et al., 1993). Cette enzyme intervient dans la synthèse des œstrogènes à partir des précurseurs androgéniques. L'inhibition de la synthèse des œstrogènes et donc, la baisse de leur biodisponibilité diminueraient ainsi de façon significative les risques de survenue de cancers.

1.10 Effet de l'exercice physique sur l'incidence des maladies cardio-vasculaires :

L'exercice physique requiert de l'énergie provenant de deux sources, notamment des glucides et des lipides. Néanmoins, la source majeure d'énergie musculaire reste les triglycérides entreposés dans les tissus adipeux mais disponibles sous forme d'acide gras libres (Poirier et Despres, 2001). En effet, l'exercice physique est l'un des plus grands stimuli physiologiques de la lipolyse (Klein et al, 1991). Chez les femmes, il a été montré que les taux de lipolyse étaient plus élevés au niveau abdominal sous-cutané qu'au niveau du tissu adipeux fémoral durant l'exercice physique (Reynisdottir et al., 1995).

Or, nous avons vu que le vieillissement était associé à une redistribution de la masse grasse au niveau abdominal et viscéral tant chez les hommes que chez les femmes en postménopause (Rendell et al., 2001) et que cette accumulation du gras au niveau central s'accompagnait d'une altération du profil lipidique (Tchernof et al., 2000) suivi d'un ensemble de troubles métaboliques tels qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline et l'obésité. L'exercice physique représente l'une des premières stratégies pour prévenir le gain pondéral et l'accumulation de gras au niveau central. Dans ce sens, plusieurs études randomisées ont montré qu'en agissant sur le gras viscéral, l'exercice physique permettait une réduction significative des facteurs de risque des MCV.

En effet, Short et ses collaborateurs ont montré qu'un programme d'exercice aérobie durant quatre (4) mois, chez des sujets âgés de 22 à 87 ans, permettait une diminution du gras abdominal et des triglycérides plasmatiques (Short et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus dans plusieurs autres études prospectives et transversales (Hunter et al., 1996) qui ont ainsi montré, par exemple, que les femmes plus actives avaient un taux réduit de maladies cardiovasculaires.

Giannopoulou et ses collaborateurs (Giannopoulou et al., 2005) ont montré que ce n'est qu'après avoir ajouté de l'exercice physique à une diète hypocalorique qu'on observait une amélioration significative du gras viscéral chez les femmes atteintes de diabète de type 2.

L'exercice physique contribuerait d'autre part à la réduction du risque de MCV en agissant sur l'amélioration de la compliance vasculaire (Hambrecht et al., 2000). En effet,

il a été montré que l'exercice physique augmente la production vasculaire du monoxyde d'azote (NO), l'un des plus puissants vasodilatateurs, en élevant l'expression de l'isoforme endothélial de la NO-synthase (eNOS) d'une part, et d'autre part, il exercerait des propriétés anti-oxydantes en prévenant la dégradation du NO par les radicaux libres et ce, en diminuant significativement l'expression et l'activité de la NAD(P)H oxydase de même que l'expression du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT-R1) (Hambrecht et al., 2006).

De par ses effets positifs sur plusieurs voies métaboliques de l'organisme, notamment sur l'amélioration de l'utilisation du glucose par les muscle et le tissu adipeux sous-cutané (Stallknecht et al., 2000), sur l'amélioration du profil lipidique par réduction du gras abdominal (Ibanez et al., 2005) et de la vasodilatation des artères cardiaques, l'activité physique se doit d'être la stratégie de premier choix pour prévenir la survenue d'un certains nombres de conditions pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires.

1.11 Conclusion sommaire :

La ménopause est caractérisée par une altération du profil lipidique plasmatique et une augmentation du syndrome métabolique en réponse à une accumulation excessive du gras au niveau abdominal. Cette altération du profil lipidique se traduit par une augmentation des concentrations plasmatiques des triglycérides et des LDL-cholestérol qui peuvent être oxydés, au niveau des parois vasculaires, par les radicaux libres produits en excès au cours du vieillissement. Ceci aboutit à une accumulation des lipides oxydés au niveau des artères importantes des jambes, du cœur et du cerveau. Cette accumulation est associée à une augmentation de la survenue des lésions athérosclérotiques.

Bien que plusieurs études prospectives aient montré l'effet positif des œstrogènes de synthèse (THS) dans la diminution des risques de MCV, d'autres résultats au contraire montrent que l'utilisation des hormones de remplacement est non seulement associée à une augmentation de l'incidence de cancers mais aussi qu'elle augmenterait également le risque de MCV. Contrairement à la THS, les phytohormones auraient la propriété de réduire les risques de MCV sans pour autant entraîner les divers effets observés lors de l'utilisation des hormones de synthèse et présenteraient de ce fait une alternative de traitement intéressante.

Aucune recherche randomisée à double insue ayant comme objectif principal l'étude de l'incidence des phytoestrogènes et de l'exercice sur les facteurs de risques des maladies cardiovasculaires n'a été réalisée à ce jour. En effet, il semble qu'une seule étude (Goodman-Gruen & Kritz-Silverstein, 2001) a évalué l'effet d'une diète en isoflavone sur

la composition corporelle (masse grasse) des femmes ménopausées. Cette recherche a révélé un effet significatif sur le taux de masse grasse ce qui laisse supposer que les phytoestrogènes pourraient exercer un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires.

En somme, l'intérêt de notre étude vient du fait qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, un traitement hautement satisfaisant pour prévenir le risque des MCV chez les femmes post-ménopausées présentant une surcharge pondérale. Des résultats publiés tout au long de ces 10 dernières années nous révèlent un intérêt grandissant pour les phytohormones comparativement aux œstrogènes de synthèse et ce, du fait de leur effet sur l'amélioration, à divers niveaux, des facteurs de risque des MCV sans entraîner une augmentation de l'incidence de cancer chez cette population. Aussi, quelques études ont montré des effets synergiques de la THS associée à l'exercice physique sur le cholestérol total, les LDL-chol et les HDL-chol (Binder, Birge, & Kohrt, 1996). Dans ce sens, nous nous proposons ainsi de tester l'effet des phytoestrogènes associés à l'exercice physique sur un ensemble de prédicteurs de maladies cardiovasculaires.

II Hypothèse et objectifs de recherche

Notre hypothèse stipule que la supplémentation en phytoestrogènes associée à l'exercice physique chez les femmes postménopausées et obèses diminue les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires en réduisant le stress oxydatif et en augmentant les propriétés antiathérogènes des HDL par leur effet sur l'activité de la paraoxonase 1.

Notre objectif principal est donc de vérifier l'effet de 12 mois de supplémentation en phytoestrogènes et de six (6) mois d'exercice physique sur un ensemble des marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la PON 1 chez les femmes postménopausées et obèses. Puis secondairement, nous voulons déterminer les mécanismes à l'origine de l'augmentation de l'activité de la PON 1 impliquant la leptine et le stress oxydatif.

III MÉTHODOLOGIE

3.1 Devis de recherche et dispositif de l'étude :

Il s'agit d'une étude randomisée à double insu au cours de laquelle nous avons administré, pendant 12 mois, un supplément en phytoestrogènes. Notre échantillon de sujets était divisé en deux groupes : Un groupe placebo et un groupe auquel nous avons administré une supplémentation en phytoestrogènes au cours des 6 premiers mois de l'étude, délai après lequel tous les groupes ont été soumis, en plus des phytoestrogènes ou un placebo, à 6 mois d'exercice physique.

La taille de l'échantillon a été calculée en tenant compte de la différence attendue dans les changements obtenus suite à l'intervention (phytoestrogènes vs. Placebo). Nous avons considéré qu'une différence entre les deux groupes, dans la perte de la masse grasse de 0.8 kg peut être attendue après 6 mois d'intervention (Sipila et al., 2001). Des études antérieures démontrent, en effet, qu'une intervention de 6 mois est faisable chez les femmes ménopausées en surpoids avec un bon taux de rétention (Fox et al., 1996). À cette effet, le taux de rétention attendu de 80% (Dionne, Melancon, Brochu, Ades, & Poelhman, 2004; Fox et al., 1996) permettra de terminer l'étude avec un minimum de 20 participantes par groupe. Ce nombre est suffisant pour assurer la puissance statistique lors de la comparaison entre les groupes ($\alpha = 0.05$; $\beta = 0.80$). Ainsi, un échantillon composé de 50 participantes suffira à vérifier nos hypothèses.

Le dispositif de l'étude est présenté dans le schéma qui suit :

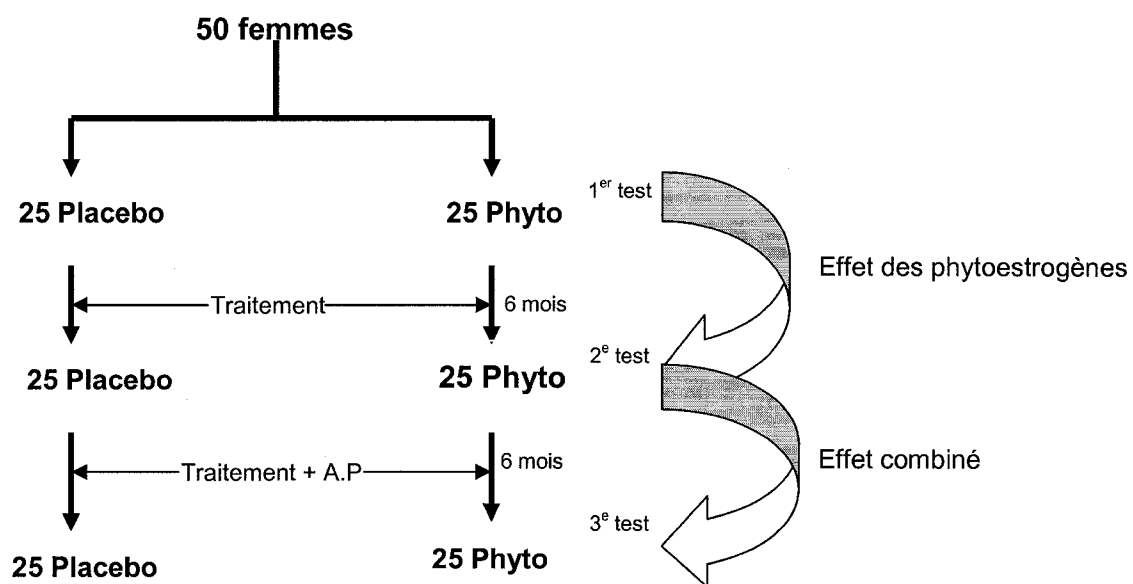


Figure 4: Dispositif de l'étude. A.P : activité physique; test : prélèvement sanguin et analyses des marqueurs du stress oxydatif.

3.2 Recrutement des sujets :

Les sujets sont recrutés par le biais d'annonces passées dans un journal local (La Nouvelle), dans des associations de personnes âgées et à l'Université du 3ème âge. Toute personne intéressée par l'étude devait joindre par téléphone le centre de recherche sur le vieillissement. Dès la prise de contact téléphonique avec un potentiel sujet, les critères d'admissibilité à l'étude étaient évalués et un rendez-vous était donné.

3.3 Critères d'inclusion :

Pour être inclus dans l'étude, chaque sujet devait répondre aux critères d'inclusions suivants :

- Être âgé entre 50 et 70 ans.
- Être ménopausée depuis au moins 12 mois.
- Un indice de masse corporel compris entre 27 et 35 kg/m², un tour de taille > 88 cm.
- Absence d'incapacités physiques.
- Avoir eu un poids relativement stable (± 2 kg) depuis 6 mois.
- Pas d'hormonothérapie depuis au moins 1 an.
- Avoir un certificat d'aptitude d'activité physique délivré par un médecin.
- Non fumeuse et buveuse modérée.
- Ne prend aucun médicament susceptible d'influencer le métabolisme du glucose et des lipides.
- Francophone ou avoir une compréhension du français écrit et parlé.

3.4 Variables à l'étude :

3.4.1 Variables indépendantes :

Les variables indépendantes sont les phytoestrogènes et l'exercice physique.

a- Les phytoestrogènes et placebo:

Chaque sujet devait prendre 4 capsules de phytoestrogènes par jour pendant 12 mois. Nous avons choisi des capsules (gélule) de phyto-soya de la compagnie française Arkopharma Ltd. Chaque gélule est composée de 325 mg de soya, 17.5 mg d'isoflavones, 83 mg de protéines, 169.5 mg de glucides totaux et 32 mg de lipides tandis que le placebo, également sous forme de gélules, était composé de farine.

b- Programme d'activité physique :

L'exercice physique consistait en trois (3) séances par semaine d'une heure données par un kinésologue. Au cours de ces séances les sujets ont été soumis à 60 minutes d'exercices, avec une alternance d'exercices aérobies (80%) et d'exercices de musculation (20%), repartis de la manière suivante :

1) Marche rapide et continue pendant 1 heure. Il s'agit ici d'un exercice cardio seulement.

2) Cours de step pendant 1 heure avec 3 blocs de 15 minutes et une pause de 2 minutes entre chaque bloc.

3) Un «circuit training», c'est-à-dire alternance d'exercices d'aérobies intenses durant 2 minutes avec 1 minute de musculation, le tout d'une durée d'environ 12 minutes. Exercice que l'on répète entre 3 et 4 fois avec des pauses de 2 minutes entre chaque série.

Il y avait deux créneaux horaires dont un cours en matinée et un cours en soirée. Les trois types d'exercices utilisés dans les séances ont été montrés équivalents en termes d'augmentation de fréquence cardiaque de 70% chez chaque sujet. Les sujets pouvaient, à la fin de chaque bloc d'exercices, mesurer et donc relever leur pouls en vue de s'assurer que les exercices répondent adéquatement à l'augmentation de la fréquence cardiaque souhaitée. Tous les sujets pratiquaient l'ensemble des exercices tout au long des six (6) mois.

3.4.2 Variables dépendantes :

Les variables dépendantes de notre étude sont de nature biochimique. Il s'agit, en effet, des marqueurs biologiques du stress oxydatif mesurés dans le sang notamment l'activité anti-oxydante totale (AAOT), l'activité de la paraoxonase 1 ainsi que les concentrations de la vitamine C, de la vitamine E, de la glutathione dissulfide (GSSG), des diènes conjugués, des dialdéhydes maloniques (MDA), et de la leptine.

3.4.3 Déroulement de l'étude :

Lorsqu'un sujet répondait à certains critères d'inclusion (âge, poids/taille et tour de taille, date de la dernière menstruation et traitements médicaux) au cours de l'entrevue téléphonique, il était invité à une visite au centre de recherche sur le vieillissement tôt en matinée (entre 7h00 et 8h30). Le sujet devait être à jeun depuis 12 heures. Un formulaire de consentement devait être signé. Le sujet était par la suite assigné aléatoirement au groupe phytoestrogènes ou placebo. Puis, la mesure de certains paramètres métaboliques et de composition corporelle étaient faite pour confirmer l'inclusion dans l'étude.

Finalement une prise de sang était effectuée pour la mesure des divers marqueurs du stress oxydatif.

3.5 Échantillons sanguins :

Un échantillon de 80 ml de sang était prélevé chez chaque sujet et mis dans six (6) tubes EDTA et 1 tube héparine. Ces tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 3800 rpm à 4°C. Le surnageant des 6 tubes EDTA est transféré dans un tube Falcon 15 ml ainsi que celui du tube héparine.

Ces échantillons sont aliquotés dans des eppendorfs (200 µl de plasma), traités pour chacune des analyses (Vit. C, GSSG, Diènes-c. MDA, Vit. E, PON1). Le plasma pour le dosage de la vitamine C et celui du GSSG sont dilués dans de l'acide métaphosphorique (MPA) 10%. L'ensemble est stocké à -80° C jusqu'au dosage de chaque paramètre.

3.6 Composition corporelle :

La mesure de la composition corporelle consiste à évaluer la densité spécifique des tissus osseux, musculaire et adipeux des membres inférieurs, supérieurs et du tronc. Celle-ci se mesure à l'aide du DXA (GE Prodigy Lunar, USA). Bien que cette méthode ne mesure pas la masse musculaire totale, celle-ci permet au moins d'évaluer 80% de la masse musculaire totale que représentent les membres inférieurs et supérieurs. Comparativement aux autres méthodes d'analyse de la composition corporelle, le DXA assure une mesure plus directe et paraît être la méthode la plus appropriée auprès d'une population âgée tant sur le plan technique que méthodologique.

3.7 Mesure de l'activité antioxydante totale :

La mesure de l'activité anti-oxydante totale (AAOT), selon la méthode de Miller et Paganga (Miller NJ et Pangaga G, 1998), est basée sur le principe du dosage, par spectrophotométrie, du radical $ABTS^{\circ+}$. En effet, lorsque l'ABTS (*2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) est incubé avec la metmyoglobine ($HX-Fe^{3+}$, qui est une peroxydase) en présence de H_2O_2 , il y a production d'un radical $ABTS^{\circ+}$ donnant au milieu réactionnel une coloration bleu-verte et dont l'absorbance peut être mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm. Cette méthode permet de mesurer la capacité anti-oxydante des fluides corporels, en l'occurrence du plasma, par la mesure de la capacité du plasma à réduire le radical $ABTS^{\circ+}$. Or, en présence d'antioxydant ou de donneurs d'électrons, comme dans le plasma, le radical $ABTS^{\circ+}$ sera capté, et par conséquent il n'y aura pas de coloration (absorbance nulle). La mesure de la longueur de la phase de temps (phase de latence) avant apparition de cette coloration nous permet d'évaluer la capacité du plasma à inhiber l'apparition du radical $ABTS^{\circ+}$.

Le dosage de l'AAOT est réalisé dans des cuvettes jetables en plastique. Pour chaque échantillon, on ajoute successivement dans un eppendorf 857 μ l de tampon phosphate (phosphate buffer saline, pH = 7.4), 8.4 μ l de plasma, 30 μ l d'ABTS (150 μ M) et 30 μ L de metmyoglobine (2.5 μ M). Le tout est incubé à 37°C dans un bain pendant 2 min après lesquelles on ajoute 75 μ l de H_2O_2 . Le contenu de l'eppendorf est déposé dans une cuvette plastique, mélangé par inversion et dosé dans le spectrophotomètre.

La metmyoglobine est préparée à partir de la transformation de la myoglobine par le potassium ferricyanide et purifiée par chromatographie d'exclusion (Sephadex).

L'AAOT moyenne est comprise entre 1.32 et 1.6 mmol/L. chez un sujet normal (Miller et al. 1998). Une AAOT inférieure à 1.32 mmol/L indique une activité antioxydante totale anormalement basse chez un sujet donné. Mircescu et ses collaborateurs (Mircescu et al., 2005) ont montré que l'albumine et l'acide urique peuvent interférer avec la capacité anti-oxydante totale réelle du plasma, et que celle-ci doit être donc calculée en tenant compte de l'effet antioxydant qui leur est attribuable. Il s'agit ici, de l'activité antioxydante résiduelle (AoGap) calculée selon la formule :

$$\text{AoGap} = \text{AAOT} - [(\text{Albumine} \times 0.69) + \text{Acide urique}]$$
 exprimée en mmol/L. Dans cette formule, 0.69 représente la TEACa (Trolox equivalent antioxidant capacity of albumin) chez l'humain.

3.8 Dosage de la vitamine C

La vitamine C présente dans le plasma est dosée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon la méthode de Rose et Bode (Rose et Bode, 1995). La première étape consiste à préparer la phase mobile d' H_3PO_4 (200 mM, pH = 3) qui servira d'éluant pour la vitamine C. La seconde étape consiste à préparer la gamme de standards. Les standards sont préparés à partir la phase mobile contenant 0.1 mM d'EDTA et d'une solution de L-ascorbate (500 μM).

Après avoir décongelé les eppendorfs dont le plasma de chaque sujet a été préalablement traité avec de l'acide métaphosphorique 10% (afin d'éviter la dégradation de la vitamine C) et conservé à -80°C , nous en transférons 100 μl dans des vials identifiés selon le numéro de chaque sujet. Les vials sont, par la suite, placés dans l'auto-injecteur

maintenu à 4° C pour être analysés. Le volume d'injection du plasma des vials, par l'HPLC, est de 50 µl pour un temps d'analyse de 14 minutes par échantillon.

3.9 Dosage de la vitamine E :

La vitamine E ou α -tocophérol (α -TOH) est l'antioxydant endogène des LDL du fait de sa liposolubilité. Son dosage se fait par HPLC et nécessite une préparation préalable de la gamme standard et une étape d'extraction.

La première étape consiste à déterminer la concentration d' α -TOH contenu dans la solution mère. Pour cela, nous procédons à une dilution au millième de l' α -TOH dans de l'éthanol. Nous mesurons par la suite la densité optique de la solution selon une longueur d'onde comprise entre 200 et 350 nm en vue de déterminer la concentration d' α -TOH en g/100 ml.

L'établissement de la gamme standard se fait par des dilutions successives de l' α -TOH et le γ -TOH dans de l'éthanol. La phase d'extraction de l' α -TOH consiste à faire une évaporation sous azote de 200 µL de chaque échantillon plasmatique auquel on a préalablement ajouté 200 µL de l'éthyl-acétate et 500 µL d'hexane. Le culot obtenu après l'évaporation complète est solubilisé dans 200 µL de la phase mobile (880 ml de méthanol, 250 ml d'éthanol 100 ml d'isopropanol et 2.59 g de perchlorate de lithium) et 60 µl de cette solution sont transférés dans des vials en vue de l'analyse par HPLC.

3.9 Dosage de diènes conjugués :

Les diènes conjugués sont mesurés par spectrophotométrie à 230 nm après dilution des échantillons de plasma au 1/10ème dans une solution de PBS à pH 7.4.

3.10 Dosage des dialdéhydes maloniques (MDA)

Les MDA sont dosés selon la méthode développée par Agarwal et Chase (Agarwal & Chase, 2002). Celle-ci consiste d'abord à préparer les solutions de BHT (Butylated hydroxytoluene) 0.05%, d'acide phosphoriques 0.44 M, de TBA (Thiobarbituric acid) 42 mM devant servir pour le dosage fluorométrique par HPLC. Après avoir effectué des dilutions successives de TEP (Tetra-ethoxypropane) 5 mM pour la préparation de la gamme standard, 50 ml de chaque échantillon de plasma et standards sont dilués dans 400 ml d'acide phosphorique, 100 ml de TBA et 50 ml de BHT puis incubé pendant 1h à 100° C. Après l'ajout de 250 ml de buthanol, l'ensemble est vortexé et 10 µl de la phase supérieure sont aliquotés et analysés par HPLC

3.11 Mesure de l'activité de la paraoxonase 1 :

L'activité paraoxonase est mesurée selon la méthode de Paragh et al., 1999 (Paragh et al., 1999). La paraoxonase 1 hydrolyse le paraxon et aboutit à la formation du p-nitrophénol. L'absorbance du composé formé est mesurée par spectrophotométrie pendant 1 min à une longueur d'onde de 412 nm pour l'activité PON1 et 270 nm pour l'activité arylesterase dans des cuvettes de quartz. Une unité d'activité paraoxonase équivaut à 1 mmol/min de p-nitrophénol formé par l'hydrolyse de paraoxon. Cette activité est évaluée en faisant la différence de l'absorbance à 60 secondes et à 0 secondes.

3.12 Efflux du cholestérol :

L'efflux du cholestérol a été évalué selon la méthode de Berrougui et al (Berrougui, et al., 2006) qui évalue la capacité qu'ont les HDL d'extraire le cholestérol des cellules en vue d'initier la voie de son transport vers le foie. Ce protocole se fait en trois (3) étapes. La première consiste à induire la prolifération et la maturation, en culture, des monocytes humains (cellules THP-1) dans un milieu RPMI enrichi de 10% de SVF et de PMA. Au cours de la seconde étape, nous faisons une séparation des HDL et LDL à partir d'échantillons de plasma de chaque sujet. Enfin, la dernière étape vise à incuber les cellules THP1, remplies de cholestérol radioactif, en présence des HDL.

Culture cellulaire :

Préparation des cellules THP1 :

Il s'agit de la phase au cours de laquelle les monocytes (10^6 cellules) vont être mis dans un milieu enrichi avec 100 nM de PMA (Phorbol-ester 12-myristate 13-acétate) pour permettre leur différenciation en macrophages. Toutes les manipulations se font sous une enceinte biologique, les cellules doivent dans un premier temps être incubées dans 1 ml du milieu RPMI contenant un antibiotique (streptomycine). L'ensemble de ces cellules est mis en incubation à 37° C dans des flacons pour leur prolifération. Le milieu cellulaire doit être remplacé tous les jours. Dès que les cellules THP1 sont en nombre suffisant, soit 10^6 cellules, ces derniers peuvent par la suite être transformées en macrophage à partir d'un milieu RPMI contenant 1.5 µl de PMA et 1.2 µl de β-mercapto-éthanol à 35° C pendant 96 heures.

Après la transformation des THP-1 en macrophages, nous procédons à leur marquage au cholestérol marqué au tritium. Si on considère l'incubation des cellules dans 14 plaques à six puits, c'est-à-dire 84 puits, cette étape doit commencer par préparation d'un mélange de 12 ml de RPMI avec SVF 10% et 108 ml de RPMI sans SVF, soit une solution RPMI de 120 ml contenant 24 μCi de ^3H -cholestérol. Les cellules sont incubées en présence de 0.2 $\mu\text{Ci/ml/puits}$ pendant 36 heures.

Séparation et purification des HDL:

La purification des HDL devant être incubées avec les macrophages contenant le cholestérol radioactif se fait en trois grandes étapes. La première étape consiste à ultracentrifuger, en présence du KBr (381.6 mg/ml), 1.750 ml de chaque échantillon de plasma en vue de séparer les lipoprotéines selon leur densité. Ce plasma est ultracentrifugé à 100 000 RPM pendant 2h et les HDL sont retirées des tubes à centrifugation à l'aide d'une seringue.

La seconde étape consiste à faire une dialyse des HDL dans 5 ml d'une solution de tampon phosphate (10^{-2} M) de pH égale à 7.0 au travers d'une membrane à dialyse. La membrane de diamètre de 6.4 mm (Spectra/Por, Fisher Scientific). Enfin, la dernière étape consiste à faire un dosage des protéines des HDL selon la méthode de Bradford. Ce dosage permet de déterminer le volume de HDL nécessaire à pipeter, pour chaque sujet, de façon à ramener les différents échantillons à la même concentration protéique (0,1mg/ml) lors de l'incubation avec les cellules THP1 dans les puits.

Incubation des THP1 marqués en présence des HDL :

Cette étape fait suite au marquage des THP1 au cholestérol radioactif dans des plaques à six (6) puits. Au cours de cette étape, les THP1 radioactives sont incubées avec des HDL pendant 24h. Après avoir préparé 500 ml de PBS (pH = 7.4) à laquelle nous avons ajouté 0,2% de BSA (serum bovine albumin), nous commençons par récupérer, à l'aide d'une pipette stérile, le contenu radioactif des plaques. Chaque puits préalablement identifié est lavé avec du PBS (50 mM; pH 7.4) avant d'y ajouter des volumes adéquats des HDL de chaque sujet. Le volume des HDL dans les puits dépend de la concentration protéique des HDL de chaque sujet. 1 ml du milieu contenu dans chaque puit est transféré dans des vials. La quantité du cholestérol extraite des THP1 par le HDL est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman 1600-TR).

3.13 Dosage de la leptine :

La leptine est dosée selon la méthode ELISA (Biosource international, California, Immunoassay Kit). Au cours de celle-ci, les échantillons de plasma sont incubés dans des puits au niveau desquels ils ont été soumis à deux anticorps monoclonaux de souris (anti-leptine humaine) : un anticorps de capture (anticorps primaire) et un anticorps de détection (anticorps secondaire). 100 µl de la solution d'anticorps monoclonal spécifique pour la leptine humaine a été préalablement ajouté dans chaque puits (plaque à 96 puits) et incubé pendant 2h. Après cette première incubation, un second anticorps monoclonal biotinylé (100 µl) est ensuite ajouté et l'excès de ce second anticorps est retiré après une incubation de 30 minutes. Puis nous ajoutons l'enzyme streptavidine-peroxydase qui lui, se fixe à l'anticorps biotinylé. À l'issue de cette incubation de 20 minutes à la température pièce et après s'être assuré de retirer l'excès d'enzyme non lié, une solution de 100 µl

chromogène stabilisé servant de substrat pour la streptavidine-peroxydase y est ajoutée et produit une couleur jaune. Le dosage de la leptine, après l'ajout de 100 µl de la solution stop dans chaque puits, c'est fait à partir d'un lecteur de plaques (microplat reader, BIORAD Compagny) qui permet la lecture en calorimétrie selon une longueur d'onde déterminée. Dans ce cas, la longueur d'onde était de 450 nm. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration de leptine présente dans le plasma.

3.14 Analyses statistiques :

Les sujets de l'étude ont été suivis pendant 1 an et évalués à 3 moments : en début de l'étude (T0) afin de déterminer les niveaux de base de chaque paramètre, après 6 mois de traitement phytoœstrogène (T1) et à la fin de l'étude (T2), après avoir été soumis à six (6) mois combinés de l'exercice physique. Un test-t pour échantillons indépendants a été utilisé pour la comparaison des deux groupes au début de l'étude. Compte tenu du taux d'abandon élevé et donc d'une faible taille d'échantillon à la fin de l'étude, des tests non-paramétriques ont été effectués, notamment le test de Mann-Whitney pour la comparaison de moyennes entre les deux groupes à différents temps et le test de Wilcoxon pour la comparaison de moyennes intragroupe entre les différentes mesures. Dans certains cas, le test paramétrique d'analyse de variances (ANOVA) à mesures répétées a été effectué pour mieux estimer l'effet du changement entre les groupes.

IV. RÉSULTATS :

Au début de l'étude, les deux groupes étaient identiques en termes de caractéristiques métriques, biochimiques et de composition corporelle (Voir Tableau 1). Les groupes qui ont complété l'étude étaient également comparables entre eux (Voir tableau 2)

Variables	Phytoestrogènes (n29)	Placebo (n28)	
Âge (années)	57.1 ± 1.03	58.41 ± 1.01	<i>p = 0.701</i>
Tour de taille (cm)	97.83 ± 2.51	100 ± 2.19	<i>p = 0.295</i>
Ratio taille/hanche	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.01	<i>p = 0.994</i>
HDL (mM)	1.5 ± 0.09	1.44 ± 0.06	<i>p = 0.581</i>
LDL (MM)	3.2 ± 0.15	3.2 ± 0.16	<i>p = 0.954</i>
TG (mg/dl)	1.58 ± 0.14	1.49 ± 0.13	<i>p = 0.434</i>
Masse grasse (Kg)	35.22. ± 1.44	35.89 ± 1.49	<i>p = 0.454</i>
Masse grasse (%)	46.12 ± 0.64	46.21 ± 0.88	<i>p = 0.372</i>
IMC (Kg/m ²)	30.89 ± 0.83	31.99 ± 0.92	<i>p = 0.668</i>

Tableau 1: Caractéristiques des sujets au début de l'étude.
Les résultats sont donnés sous forme de moyenne ± écart-type.

Variables	Phytoestrogènes (n10)	Placebo (n11)	
Âge (années)	55.2 ± 1.6	56.9 ± 1.3	<i>p</i> = 0.678
Tour de taille (cm)	93.77 ± 4.06	95.3 ± 2.21	<i>p</i> = 0.453
Ratio taille/hanche	0.84 ± 0.01	0.86 ± 0.01	<i>p</i> = 0.537
HDL (mM)	1.48 ± 0.09	1.58 ± 0.1	<i>p</i> = 0.975
LDL (MM)	3.31 ± 0.2	3.39 ± 0.28	<i>p</i> = 0.639
TG (mg/dl)	1.31 ± 0.24	1.49 ± 0.23	<i>p</i> = 0.933
Masse grasse (Kg)	34.54 ± 2.87	35.89 ± 2.03	<i>p</i> = 0.675
Masse grasse (%)	45.78 ± 1.05	44.66 ± 1.6	<i>p</i> = 0.323
IMC (Kg/m ²)	30.91 ± 0.83	30.28 ± 0.92	<i>p</i> = 0.668

Tableau 2: Caractéristiques des sujets ayant complété l'étude.
Les résultats sont donnés sous forme de moyenne ± écart-type.

4.1 Activité antioxydante totale (AAOT) :

La figure 6 présente les résultats obtenus pour la mesure de l'AAOT aux trois temps de mesure pour les groupes phytoestrogènes et placebo. L'analyse de l'activité antioxydante totale (AAOT) nous indique qu'il n'y a aucune différence entre deux les groupes au début de l'étude (To) ($p = 0.876$), après les six (6) mois de traitement (T1) ($p = 0.191$) et après les six mois d'exercice physique associé au traitement (T2) ($p = 0.535$). Les moyennes de l'AAOT pour les trois temps dans chaque groupe pris séparément nous indiquent également qu'il n'y a aucune variation significative dans les deux groupes ($p > 0.05$).

4.2 Activité antioxydante résiduelle (AoGap) :

Lorsque l'activité antioxydante totale est corrigée pour l'albumine et l'acide urique, on remarque que les deux groupes sont identiques au départ pour la mesure de l'AoGap, puisqu'aucune différence significative n'est obtenue entre les deux groupes en To ($p > 0.05$). Par contre, après les six premiers mois de traitement, les moyennes des valeurs de l'AoGap sont significativement différentes entre le groupe phytoestrogènes et le groupe placebo ($p = 0.03^*$). En effet, l'analyse intragroupe nous indique qu'il y a eu une diminution significative de l'AoGap dans le groupe placebo seulement ($p = 0.01$).

Le test paramétrique nous indique que l'AoGap diminue, en effet, significativement dans les deux (2) groupes après les six (6) mois de traitement ($p = 0.02$), mais que la force du changement est similaire dans les groupes phytoestrogènes et placebo ($p = 0.527$). Ceci laisse suggérer ainsi que non seulement ce changement n'est pas différent entre les groupes, mais surtout que les phytoestrogènes n'ont réellement pas d'effet sur l'activité antioxydante résiduelle (Figure 7).

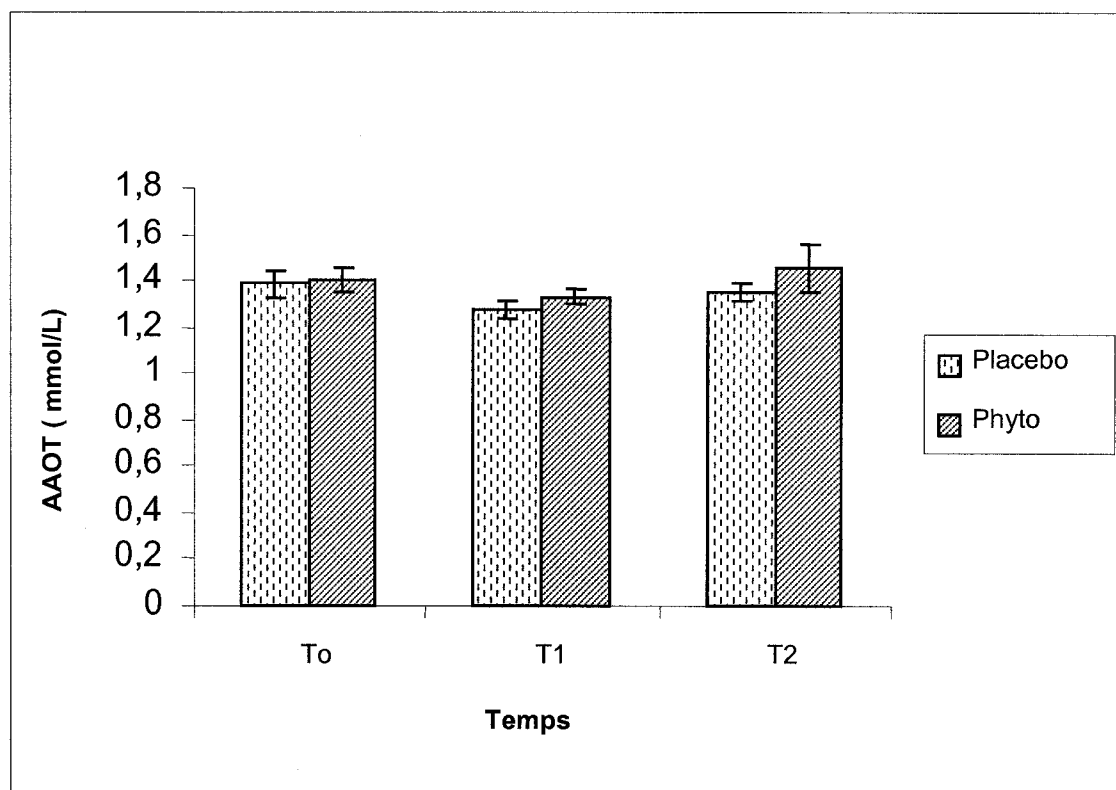


Figure 6: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité antioxydante totale.

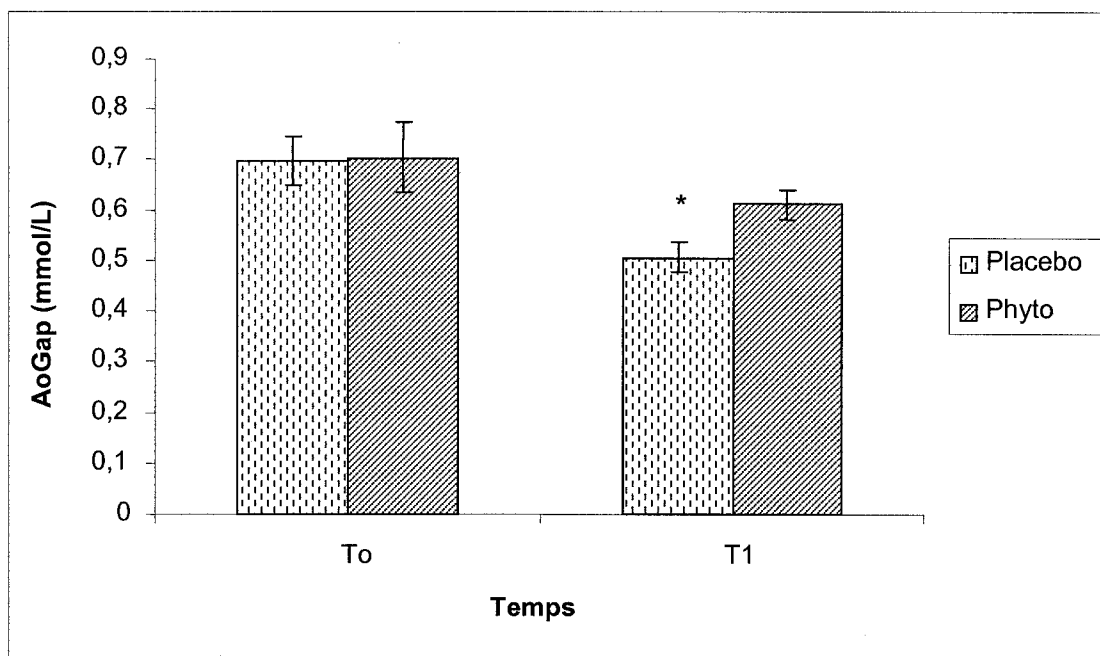


Figure 7: Effet des phytoestrogènes sur l'activité antioxydante résiduelle.

* Significativement différent de T0; $T < 0.01$

4.3 Vitamine C :

La figure 8 présente l'effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur les concentrations (en μM) de la vitamine C en différents temps. Aucune différence n'est observée entre le groupe phytoestrogènes et le groupe placebo en T0 ($p = 0.683$), en T1 ($p = 0.954$) et T2 ($p = 0.725$). Entre T0 et T1, aucune variation de la vitamine C n'a été remarquée dans les deux groupes pris séparément. Par contre, on observe une forte augmentation de la vitamine C après 12 mois de traitement dans les deux groupes puisque l'analyse intragroupe nous montre que cette augmentation est significative dans le groupe phytoestrogènes et placebo respectivement ($p < 0.05$). Mais ce changement est identique entre les deux groupes.

4.4 Vitamines E :

Les résultats de la vitamine E nous indiquent que les deux groupes augmentent sensiblement après les six premiers mois de traitement (entre T0 et T1) et diminuent fortement après les 12 mois de traitement (entre T1 et T2).

L'analyse des résultats de la vitamine E (Figure 9) nous indique que les 2 groupes sont identiques au cours des trois temps T0 ($p = 0.534$), T1 ($p = 0.356$) et T2 ($p > 0.05$).

Pourtant, une augmentation significative des concentrations plasmatiques de la vitamine E après les six mois de traitement a été observée dans le groupe phytoestrogènes

($p = 0.01$) suivie d'une baisse significative au bout des 12 mois de traitement et des 6 mois d'exercice physique dans les deux groupes ($p < 0.05$). Des tests paramétriques nous montrent que entre T0 et T1, les deux groupes varient effectivement avec le temps ($p < 0.05$) mais que cette variation était nulle, puisque l'effet du traitement était non

significatif ($p = 0.611$). Autrement dit, l'augmentation de la vitamine E observée au cours des 6 premiers mois dans le groupe phytoestrogènes n'est pas significative. Par contre, entre T1 et T2, il y a une grande diminution de la vitamine E chez les phytoestrogènes ($p = 0.011$) et le groupe placebo ($p = 0.012$).

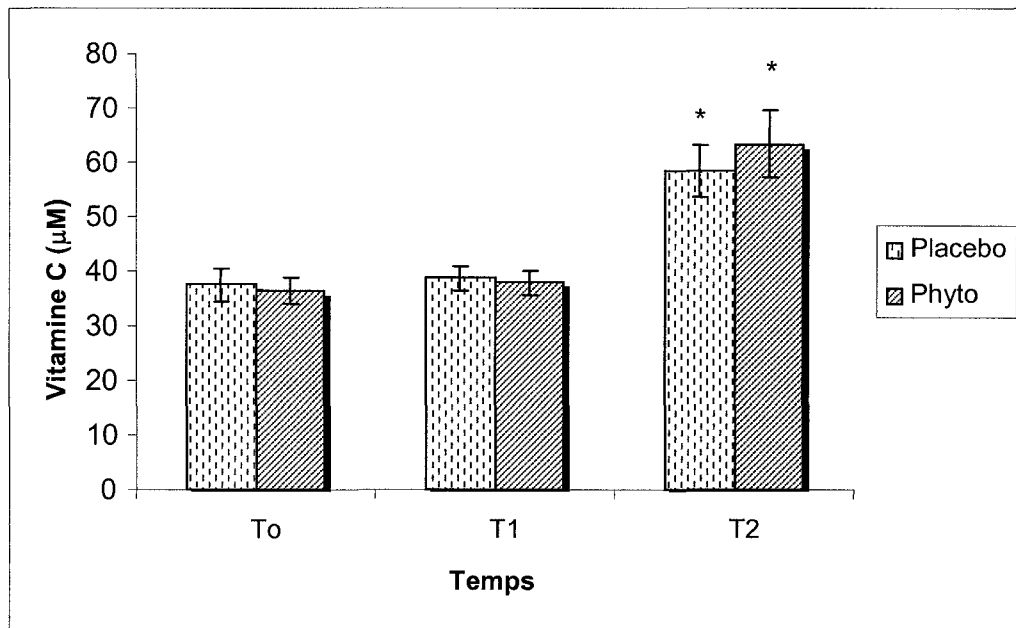


Figure 8: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur la vitamine C plasmatique.
* Significativement différent de T0 et T1; $p < 0.05$

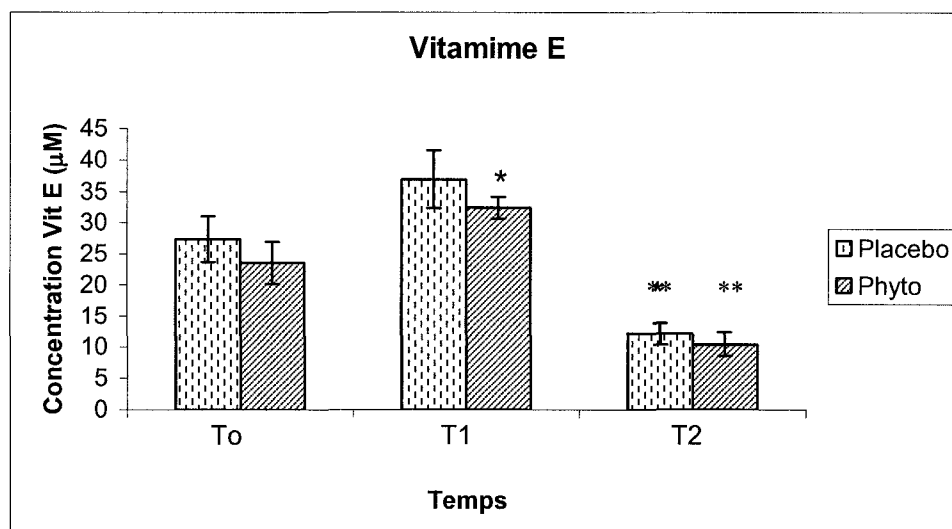


Figure 9: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur la vitamine E plasmatique. * Significativement différent de T0; $p = 0.01$. ** significativement différent de T1; $p < 0.05$.

4.5 Diènes conjugués :

La figure 10 présente les résultats obtenus lors du dosage des diènes conjugués. Celle-ci nous montre une sensible diminution des diènes conjugués au cours des six premiers mois dans le groupe phytoestrogènes et suivie d'une restauration de leur concentration à leur valeur initiale après 12 mois. Dans le groupe placebo, on observe une augmentation graduelle, mais non significative, des diènes conjugués au cours des 6 mois d'exercice aérobic ($p = 0.401$).

Une analyse des résultats nous indiquent que les deux groupes sont identiques au cours des trois temps, au début de l'étude ($p = 0.589$), après six (6) mois de traitement ($p = 0.661$) et après les six (6) mois de traitement associé à l'exercice physique ($p = 0.597$). Néanmoins, il y a une augmentation significative des diènes conjugués au bout des six (6) mois de traitement associé à l'activité physique ($p = 0.017$) se traduisant par un retour au niveau initial T0.

L'analyse ANOVA effectué nous montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes pour le changement dans le temps ($p = 0.237$).

4.6 Dialdéhyde malonique :

Les dialdéhydes maloniques (MDA) ont été mesurés au cours du temps T0 et T1. La figure 10 nous montre qu'il y a une diminution des MDA au cours des six mois de traitement. Les deux groupes sont identiques en T0 ($p = 0.191$) et en T1 ($p = 0.719$). Après les six (6) premiers mois de traitement, il y a une diminution significative des MDA dans le groupe phytoestrogènes ($p = 0.001$) et placebo ($p = 0.022$) respectivement. Ces changements sont toutefois similaires.

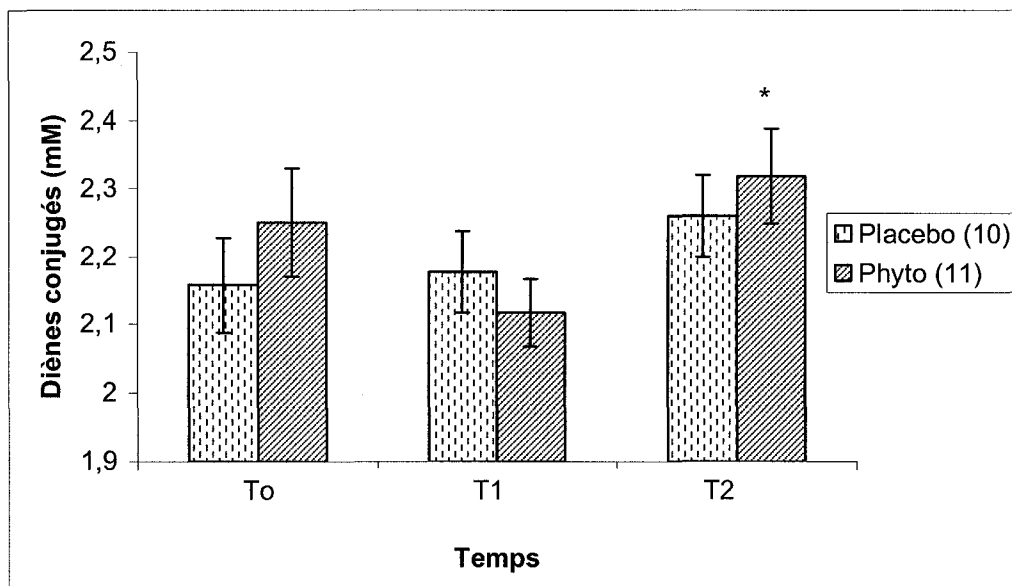


Figure 10: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur les diènes conjugués.
* Significativement différent de T0; $p = 0.017$

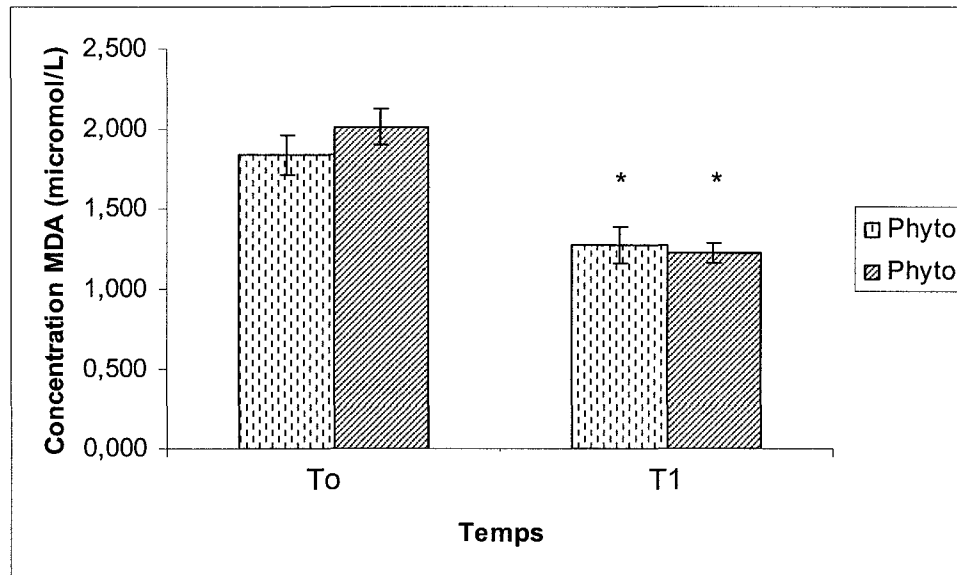


Figure 11 : Effet des phytoestrogènes sur la concentration plasmatique des MDA.
 * Significativement différent de T0; $p=0.001$ (phyto : $n = 11$), $p=0.022$ (placebo : $n = 10$)

4.7 Activité arylestérase :

La figure 12 présente les résultats obtenus pour le dosage de l'activité arylestérase de la PON1. Celle-ci nous montre une diminution de l'activité arylestérase, au cours des six premiers mois, dans le groupe phytoestrogènes, suivie par une augmentation conjointe de cette activité dans les deux groupes au bout des 12 mois de suivi.

Une analyse de ces résultats nous indique que les deux (2) groupes sont identiques au début de l'étude ($p = 0.142$), après les six (6) mois de traitement ($p = 0.940$) et au bout des six (6) mois de traitement associé à l'exercice physique ($p = 0.426$). Après une analyse intragroupe, il ressort qu'il y a une diminution significative de l'activité arylestérase dans le groupe phytoestrogènes après 6 mois de traitement ($p = 0.002$). Dans les deux groupes, il y a une forte augmentation de cette activité auprès les douze (12) mois de traitement associé aux six (6) mois de programme d'exercice physique, soit $p = 0.005$ pour le groupe phytoestrogènes et $p = 0.047$ pour le groupe placebo.

Ce changement, après les 1 an de suivi, n'est pas significativement différent entre les deux groupes, il s'agit donc ici d'un effet de l'exercice.

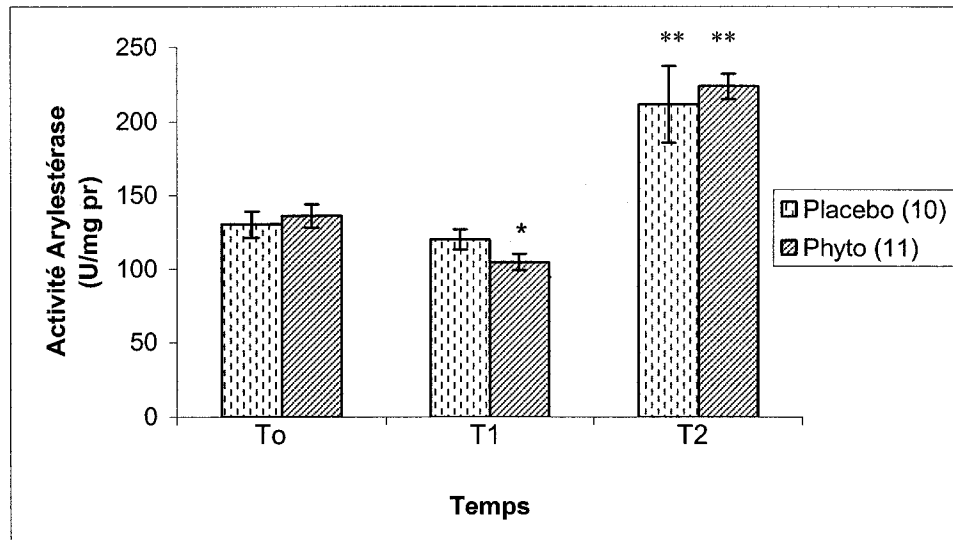


Figure 12: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité arylestérase.

* Significativement différent de T0; $p = 0.002$.

** Significativement différent de T1; $p = 0.005$ (phyto), $p = 0.047$ (placebo)

4.8 Activité paraoxonase :

La figure 13 présente les résultats obtenus lors du dosage de l'activité paraoxonase. Au cours des six premiers mois, il n'y a aucune variation de l'activité paraoxonase dans les deux groupes. Par contre, on observe une forte augmentation de cette activité, tant chez les phytoestrogènes que chez les placebos, à l'issue des six mois auxquels les deux groupes ont été soumis au programme d'exercice physique.

Les groupes phytoestrogènes et placebo sont identiques au cours des trois (3) temps To ($p = 0.142$), T1 ($p = 0.940$) et T2 ($p = 0.426$). L'analyse intragroupe nous révèle qu'après les six (6) premiers mois de traitement, il y a une diminution significative de l'activité paraoxonase dans le groupe phytoestrogènes ($p = 0.011$). Après les 12 mois de traitement associé aux six (6) mois de programme d'activité physique, il y a une augmentation significative de l'activité paraoxonase dans le groupes phytoestrogènes ($p = 0.005$) et placebo ($p = 0.013$) respectivement. Ce changement n'est pas différent entre les groupes.

4.9 Efflux du cholestérol :

Indépendamment de nos variables dépendantes principales, nous avons voulu tester l'effet des phytoestrogènes sur la capacité des HDL à extraire le cholestérol qui s'accumule à l'intérieur des cellules (efflux du cholestérol). Pour ce faire nous avons sélectionné 9 sujets dans notre échantillon qui présentaient des taux de cholestérol élevés, dont 4 qui était sous traitement phytoestrogènes et 5 sur placebo. Ces sujets ont été pairés avec 9 autres sujets (4 phytoestrogènes et 5 placebo) normocholestérolemiques selon l'âge et le tour de taille. Ainsi, la mesure de l'efflux du cholestérol a été faite séparément chez les sujets ayant le cholestérol normal (Figure 14) et le cholestérol élevé (Figure 15).

Chez les femmes hyperlipidémiques, seuls les temps To et T1 ont été évalués compte tenu du fait que plusieurs d'entre elles avaient abandonné avant la fin de l'étude (T2). Aucune variation de l'efflux du cholestérol n'est observée au cours des trois temps chez les sujets normolipidiques, ni dans le groupe traité que placebo ($p > 0.05$). De même, aucune variation de l'efflux du cholestérol n'a été observée chez les femmes hyperlipidémiques. En To et T1, les groupes phytoestrogènes et placebo étaient également comparables ($p > 0.05$).

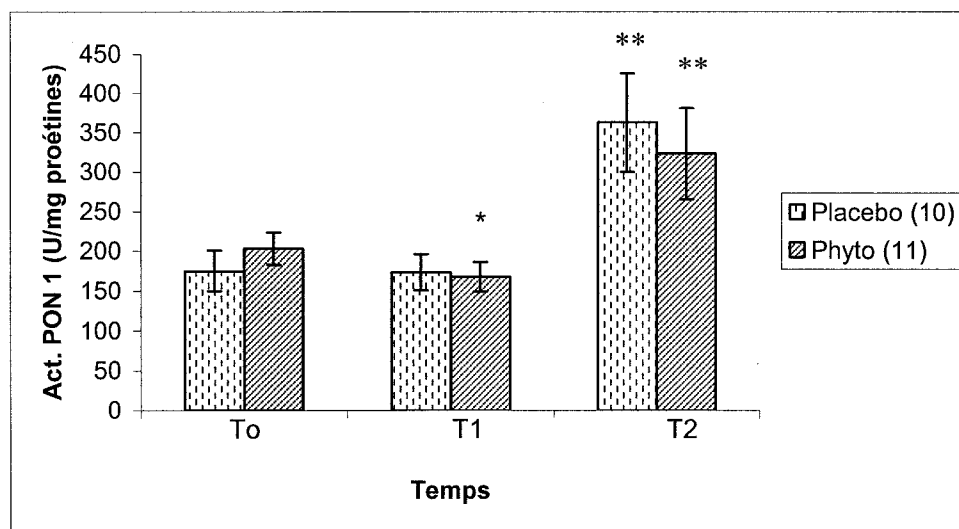


Figure 13: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice sur l'activité paraoxonase.

* Significativement différent de T0; $p = 0.01$.

** Significativement différent de T1; $p < 0.05$

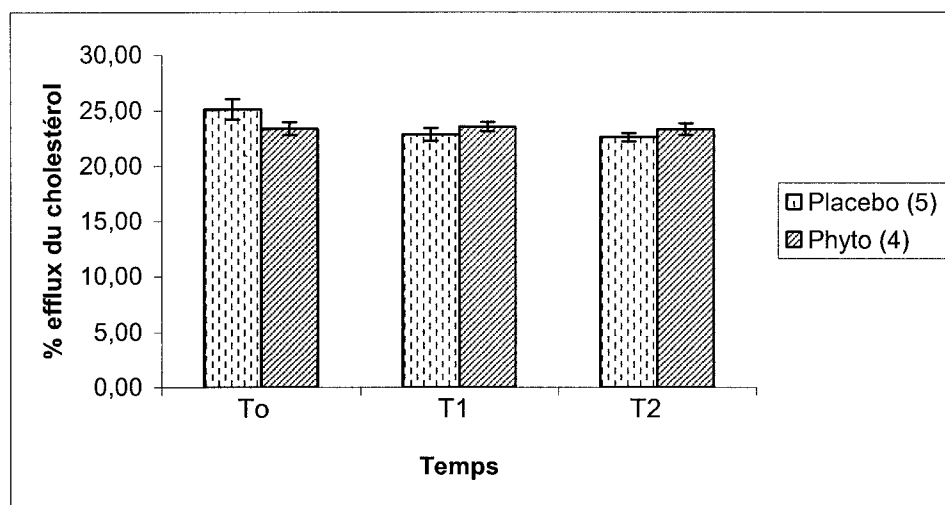


Figure 14: Efflux du cholestérol chez les sujets ayant un profil lipidique normal

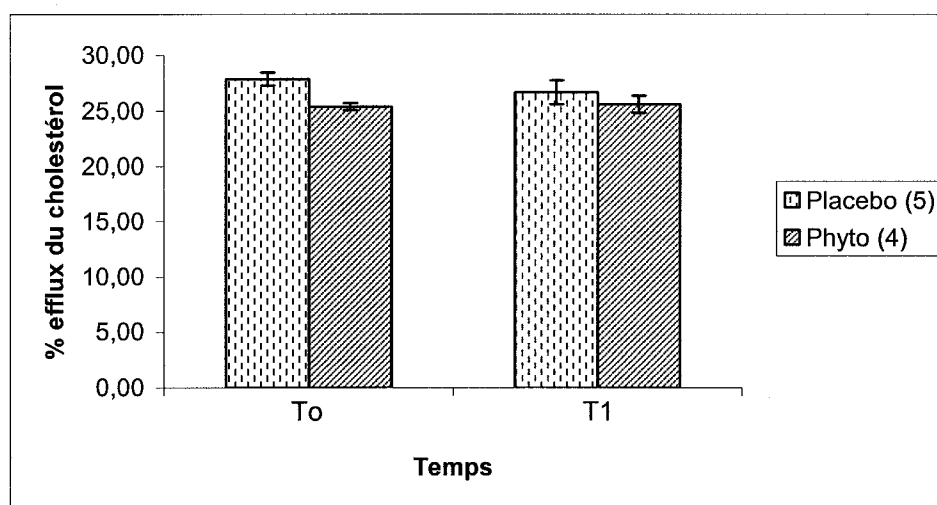


Figure 15: Efflux du cholestérol chez les sujets ayant un profil lipidique altéré.

4.10 Leptine :

La leptine a été dosée à partir des échantillons des sujets qui ont participé à l'ensemble de l'étude, c'est-à-dire ceux qui se sont présentés au trois temps de mesure. La figure 16 présente les résultats obtenus lors du dosage de la leptine. On observe une diminution progressive de la concentration de leptine plasmatique dans le groupe placebo après six mois et 12 mois tandis que celle-ci semble être maintenue dans le groupe phytoestrogènes.

L'analyse statistique des résultats obtenus nous indique que les deux groupes sont identiques au cours des trois (3) temps, To ($p = 0.143$), T1 ($p = 0.315$) et T2 ($p = 0.853$).

L'analyse intragroupe nous montre qu'aucune variation significative de concentration de leptine n'est obtenue dans les deux groupes séparément tout au long des 12 mois de traitement ($p > 0.05$).

Il n'y a donc aucune différence significative entre les deux groupes à l'issue de l'étude.

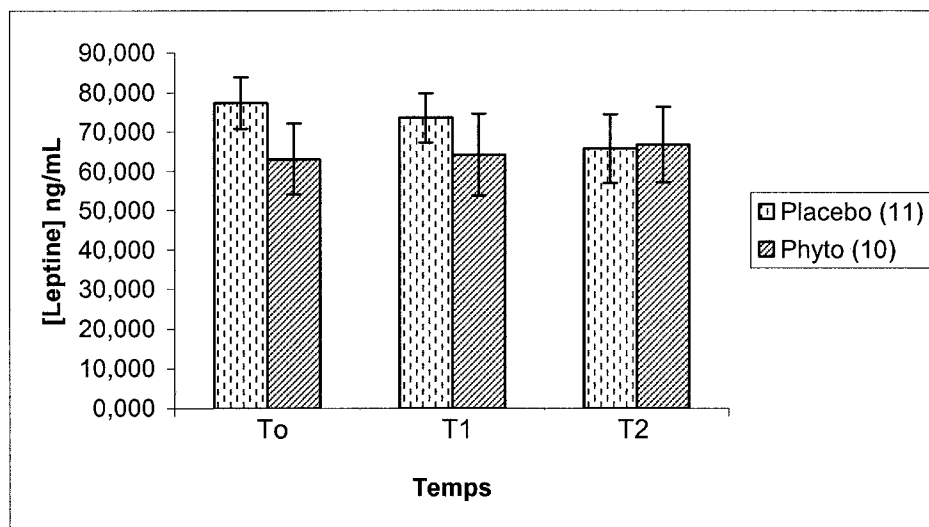


Figure 16: Effet des phytoestrogènes et de l'exercice physique sur la concentration de leptine plasmatique

V- DISCUSSION :

Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle les phytoestrogènes associés à un programme d'exercice physique diminuaient les facteurs de risque de MCV chez les femmes postménopausées et obèses en améliorant le profil plasmatique des marqueurs du stress oxydatif et l'activité de la paraoxonase 1, notre étude visait à suivre pendant une période de 12 mois des femmes postménopausées selon quelles étaient assignées aléatoirement à un groupe phytoestrogènes ou placebo. Ainsi, après avoir répondu aux critères d'inclusion, 57 femmes âgées entre 50 et 70 ans étaient randomisées. 29 femmes dans le groupe phytoestrogènes et 26 dans le groupe placebo. Cette étude s'est faite en deux phases. Au cours de la première phase, les sujets étaient soumis uniquement à 6 mois de supplémentation en phytoestrogènes ou au placebo selon le groupe de randomisation. Des prélèvements sanguins ont été faits au début et au bout de ces 6 mois. Puis au cours de la seconde phase, un programme d'exercice aérobie était ajouté aux deux groupes pour une période de six mois supplémentaire à l'issue de laquelle des tests sanguins ont à nouveau été réalisés. Au cours des six premiers mois de suivi (T1), 8 sujets ont abandonné l'étude pour des raisons personnelles. De plus, juste avant d'entamer le programme d'activité physique, 21 sujets ont dû quitter l'étude dont 9 à cause d'une contre-indication médicale pour le programme d'activité physique, 6 sujets pour des raisons professionnelles et 6 autres pour des raisons personnelles. Au cours de la seconde phase de l'étude, aucun abandon n'a été enregistré, ce qui nous a permis de terminer l'étude avec 11 sujets dans le groupe placebo et 10 dans le groupe phytoestrogènes, soit un taux d'abandon de près de 60%. Le petit nombre de sujets

explique le manque de puissance statistique observée dans les différences attendues entre les deux groupes au cours de l'analyse des différentes variables.

L'hypothèse de notre étude stipulait que la supplémentation en phytoestrogènes associée à l'exercice physique diminuait les facteurs de risque de MCV en réduisant le stress oxydatif et en augmentant le potentiel antiathérogène des HDL. Ainsi pour répondre à nos objectifs de recherche, nous avons dosé, aux trois temps de mesure, l'ensemble des marqueurs sanguins du stress oxydatif et évalué l'efflux du cholestérol et l'activité paraoxonase pour chaque sujet.

Notre étude a montré des variations significatives lors des dosages de la vitamine C et de l'activité paraoxonase. En effet, la vitamine C et la paraoxonase 1 interviennent comme antioxydants dans l'organisme humain (Carr et al., 2000; Watson et al., 1995), où ils agissent respectivement en tant qu'accepteurs d'électrons ou dans l'acquisition de la résistance au stress oxydatif des LDL. Notre étude a montré une augmentation significative de la concentration en vitamine C et de l'activité paraoxonase dans les deux groupes après 12 mois de traitement aux phytoestrogènes associés à six mois d'exercice physique. Ces changements observés dans les deux groupes laissent suggérer que l'effet positif observé serait uniquement dû au programme d'exercice physique et non aux phytoestrogènes.

Cette augmentation de la vitamine C et de l'activité paraoxonase est sans doute la conséquence d'une réponse adaptative de l'organisme induite par l'augmentation du stress oxydatif lors l'exercice physique. En effet, en plus de l'implication du

vieillesse sur l'augmentation des radicaux libres (Khalil et al., 2002), il a été démontré que l'activité physique augmentait également le stress oxydatif (Packer et al., 1982; Filaine et al., 2006). L'amélioration de la teneur en vitamine C et l'augmentation de l'activité paraoxonase pourraient donc être le résultat d'une réponse adaptative de l'organisme au stress oxydatif induit par l'exercice physique (Apor et Radi, 2006).

D'autre part, même si certaines recommandations ont été données au début de l'étude, nous pensons aussi que l'augmentation de la vitamine C observée à l'issue des 12 mois de l'intervention pourrait s'expliquer aussi par un changement dans l'alimentation des sujets au cours de l'étude. Pour cela, une analyse du journal alimentaire de chaque sujet pourrait soutenir ou non cette hypothèse. Néanmoins, il reste que le profil identique observé dans l'augmentation de l'activité arylestérase, paraoxonase et de la vitamine C va en faveur d'un effet positif de l'exercice physique qui semble potentialiser différents systèmes antioxydants en réponse à une augmentation de stress. L'activité arylestérase représente la quantité protéique de l'enzyme PON1. L'augmentation de cette activité laisse suggérer une augmentation de la production de la PON1. Ainsi, nos résultats montrent que l'activité physique induit une augmentation de la synthèse de la protéine PON1, qui se fait exclusivement dans le foie, et une amélioration de son activité au niveau des HDL. Dans le même sens, l'activité physique entraînerait une régénération de la vitamine C à partir de l'acide dihydro-ascorbique (vitamine C oxydée) en stimulant l'activité des complexes d'oxydoréduction FADPH /FADP et GSH/GSSG.

Dans le même sens, la vitamine E a grandement diminué dans les deux groupes au bout des 12 mois de suivi bien que celle-ci demeure relativement constante au cours des six premiers mois de traitement. Cette variation conjointe dans les deux groupes supporte également l'influence du programme d'exercice physique seul. En effet, la vitamine E étant l'un des principaux antioxydants endogènes des LDL, une augmentation du stress oxydatif causé par l'exercice physique a sans doute entraîné une consommation de cette vitamine E qui agit préférentiellement comme accepteur d'électrons au niveau de la membrane des LDL dans le but d'arrêter la phase de propagation de la peroxydation lipidique (Khalil, 2002; Kontush et al., 1996). Ceci semble se caractériser par une diminution subséquente de la forme réduite de la vitamine E (α -TOH) observée après la session d'exercice physique et sans doute par une augmentation de sa forme oxydée (α -TO \cdot). Étant donné que la vitamine C intervient dans la régénération de la vitamine E au niveau de la membrane des LDL, nous pensons que l'augmentation de la vitamine C observé au bout des 12 mois serait une adaptation de l'organisme en vue de permettre l'élimination du radical tocophéryl qui se forme après l'oxydation de l' α -TOH. Ce radical en s'accumulant pourrait agir comme pro-oxydant à l'égard des LDL (Bowry et al., 1992).

D'autre part, notre étude n'a révélé aucune variation significative de l'activité antioxydante totale, de la leptine et d'autres marqueurs du stress oxydatif tels que les MDA et les diènes conjugués. En effet, les résultats de notre étude nous indiquent que les phytoestrogènes seuls ou associés à l'exercice physique n'ont aucun effet sur le potentiel antioxydant total plasmatique chez les femmes postménopausées, puisque les valeurs de

l'AAOT dans les deux groupes sont restées pratiquement stables au cours des trois temps de mesure. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans les deux groupes, même lorsque les sujets sont pris individuellement, les valeurs de l'AAOT au départ de l'étude étaient déjà comprises dans l'intervalle de référence normal qui est de 1.32 à 1.6 mmol/L (Miller, 1998). En émettant l'hypothèse que les phytoestrogènes améliorent l'AAOT chez les femmes postménopausées ayant un gain pondéral, nous devrions nous attendre à ce que cet effet soit significatif si nous avons inclus dans l'étude que des sujets dont l'AAOT est déjà significativement bas, c'est-à-dire en dessous de l'intervalle de référence.

Même après avoir corrigé pour l'acide urique et l'albumine, les valeurs de l'activité antioxydante résiduelle (AoGap) obtenues demeurent aussi constantes après les six premiers mois de traitement. Par conséquent, nous pouvons conclure que les phytoestrogènes ne semblent pas agir sur l'AAOT, ni sur l'AoGap chez les sujets présentant déjà des valeurs normales pour ces deux paramètres.

Dans le même sens, l'analyse de la leptine ne nous révèle aucune variation significative dans les deux groupes après les 12 mois de traitement. Ce résultat rejoint ceux obtenus par Hayase et ses collaborateurs (2002) qui ont comparé l'effet de l'exercice physique sur les concentrations de leptine plasmatique chez les femmes pré- et postménopausées (Hayase et al., 2002). La leptine étant une hormone produite par les hépatocytes, on aurait dû s'attendre à un effet de l'exercice sur les taux de leptine circulant. En effet, en avançant l'hypothèse selon laquelle l'exercice physique entraîne une diminution de la taille des hépatocytes en induisant une hydrolyse des acides gras, on pourrait s'attendre à

voir une diminution subséquente de la production de la leptine et donc une baisse au niveau plasmatique, puisque les taux de leptine ont été fortement corrélés au pourcentage de gras corporel (Martin et al., 1998) mais surtout à une baisse du tissu adipeux sous-cutané (Hayase et al 2002).

Nos résultats peuvent en partie s'expliquer par le fait que les sujets inclus dans l'étude avaient déjà des valeurs de leptine normales, soit des moyennes 63.08 ng/ml dans le groupe phytoestrogènes et 77.39 ng/ml dans le groupe placebo. De ce fait, nous ne devons pas nous attendre à voir ces concentrations diminuer sous les valeurs physiologiques normales même lorsque les sujets sont soumis à un programme d'exercice visant à réduire le gras en excès.

Enfin, nous avons voulu tester l'effet des phytoestrogènes sur la capacité qu'ont les HDL à extraire le cholestérol en excès des cellules. Dans ce sens, aucun résultat significatif n'a été obtenu tant chez les sujets normolipidémiques qu'hyperlipidémiques. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Mikkola et ses collaborateurs (Tormala et al., 2006) qui n'ont également obtenu aucun effet des phytoestrogènes sur l'efflux du cholestérol. Ce qui permet ainsi d'avancer que les phytoestrogènes ne préviennent pas la survenue des MCV par ce processus.

Limites de l'étude :

Plusieurs femmes ont présenté des contre-indications à l'exercice et nous n'avons ainsi entamé la session d'exercice physique qu'avec 10 sujets dans le groupe phytoestrogènes et 11 sujets dans le groupe placebo. Ceci a contribué à la diminution de la puissance statistique qui pouvait nous permettre d'observer de réelles différences dans la variation des divers marqueurs du stress oxydatif mesurés.

D'autre part, le manque d'effet des phytoestrogènes pourrait également s'expliquer par le fait que la plupart des sujets avaient un profil lipidique normal au moment de leur inclusion dans l'étude. Si nous voulions en effet tester l'effet thérapeutique des phytoestrogènes à l'égard des marqueurs du stress oxydant, il aurait été intéressant pour nous d'inclure dans notre étude que des sujets présentant d'importantes altérations du profil lipidique et des symptômes de syndrome métabolique. Il aurait été intéressant pour nous de ne considérer par exemple que ceux présentant un IMC bien supérieur à 30 kg/m².

De manière paradoxale, non seulement il nous serait assez difficile de recruter des sujets ayant ces caractéristiques, mais surtout, pour des raisons éthiques il ne serait pas recommandé de les inclure dans notre étude. Car, en effet, des sujets qui présentent un niveau de facteurs de risque de MCV aussi élevé sont sans doute déjà sous prescription médicale. Compte tenu du fait que l'efficacité des phytoestrogènes à l'égard de ces facteurs de risque reste encore à être prouvée, il nous serait impossible de demander à ces sujets d'interrompre leur traitement pour ne prendre que la supplémentation d'isoflavones.

Enfin, le devis de l'étude ne nous a pas permis de discriminer réellement l'effet des phytoestrogènes seuls et associés au programme d'exercice physique après les 12 mois de suivi. Étant donné qu'il s'agit ici d'une étude pilote, il serait intéressant comme perspective d'initier une étude sous forme de devis factoriel, dans laquelle les sujets seraient randomisés dans 4 groupes différents notamment un groupe phytoestrogènes, un groupe placebo, un groupe phytoestrogènes plus exercice et enfin, un groupe placebo plus exercice. En suivant les sujets pendant 12 mois, cette étude nous permettra de mieux distinguer l'effet des phytoestrogènes de celui de l'exercice physique ou des deux combinés.

VI- CONCLUSION :

Les phytoestrogènes représentent une alternative intéressante à l'hormonothérapie de synthèse en ce sens que des études épidémiologique et *in vitro* tendent à montrer leurs effets dans la diminution des facteurs de risque des MCV sans pour autant entraîner des effets secondaires tels que l'augmentation de l'incidence des cancers. Dans le but de répondre à cette préoccupation, notre étude avait pour objectifs de tester l'effet des phytoestrogènes associés à un programme d'exercice physique sur un ensemble de marqueurs du stress oxydatif et particulièrement sur les propriétés antiathérogènes des HDL. À l'issue de cette étude, l'effet positif de l'exercice physique sur la vitamine C et l'activité paraoxonase a réellement été observé. Le manque de puissance statistique causée par le nombre important d'abandon et aussi notre dispositif de l'étude à deux groupes seulement expliqueraient en grande partie le fait que nous soyons passés à côté d'un effet réel des phytoestrogènes. Ainsi, cette étude nous a permis d'entrevoir les points essentiels à améliorer en vue de l'élaboration de meilleurs devis de recherche qui pourront pleinement nous permettre de mieux juger de l'efficacité des phytoestrogènes.

RÉFÉRENCES

1. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997). *Lancet*, 350(9084), 1047-59.
2. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). (2001). *JAMA*, 285(19), 2486-97.
3. Abudu, N., Miller, J. J., Attaelmannan, M., & Levinson, S. S. (2004). Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta*, 339(1-2), 11-25.
4. Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T. et al. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44(2), 147-53.
5. Agarwal, R., & Chase, S. D. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 775(1), 121-6.
6. Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., & De Aloysio, D. (1998). The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*, 91(1), 6-11.

7. Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995a). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, 333(5), 276-82.
8. Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995b). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, 333(5), 276-82.
9. Anthony, M. S. (2000). Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *J Nutr*, 130(3), 662S-3S.
10. Apor, P., & Radi, A. (2006). [Physical exercise, oxidative stress and damage]. *Orv Hetil*, 147(22), 1025-31.
11. Aviram, M., & Rosenblat, M. (2005). Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*, 16(4), 393-9.
12. Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M., & Khalil, A. (2006). Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 184(2), 389-96.
13. Binder, E. F., Birge, S. J., & Kohrt, W. M. (1996). Effects of endurance exercise and hormone replacement therapy on serum lipids in older women. *J Am Geriatr Soc*, 44(3), 231-6.

14. Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., & Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1(4), 619-25.
15. Boulanger, P., Polonovski, J., Biserte, G., & Dautrevaux M. (1989). Les lipides. P. Boulanger, J. Polonovski, G. Biserte, & Dautrevaux M. *Biochimie médicale: Les constituants des organismes vivants* (Masson 2e édition ed., pp. 58-85).
16. Bowry, V. W., Ingold, K. U., & Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J*, 288 (Pt 2), 341-4.
17. Burger, H. G. (1996). The endocrinology of the menopause. *Maturitas*, 23(2), 129-36.
18. Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H. et al. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, 348(9021), 159-61.
19. Carr, A. C., McCall, M. R., & Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(7), 1716-23.
20. Carr, A. C., Zhu, B. Z., & Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res*, 87(5)

), 349-54.

21. Chehab, F. F. (2000). Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharmacol Sci*, 21(8), 309-14.
22. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M. L., Freeman, M. W., & Zannis, V. I. (2004). Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry*, 43(7), 2126-39.
23. Clarkson, T. B., Anthony, M. S., & Morgan, T. M. (2001). Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(1), 41-7.
24. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R. et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334(5), 292-5.
25. Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(4), 1198-205.
26. de Kleijn, M. J., van der Schouw, Y. T., Wilson, P. W., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D. E. et al. (2001). Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr*, 131(6), 1826-32.

27. Dionne, I. J., Melancon, M. O., Brochu, M., Ades, P. A., & Poelhman, E. T. (2004). Age-related differences in metabolic adaptations following resistance training in women. *Exp Gerontol*, 39(1), 133-8.
28. Dixon, R. A. (2004). Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 225-61.
29. Dodin, S., Blanchet, C., & Marc, I. (2003). [Phytoestrogens in menopausal women: a review of recent findings]. *Med Sci (Paris)*, 19(10), 1030-7.
30. Draganov, D. I., & La Du, B. N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(1), 78-88.
31. Dubey, R. K., Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (2004). Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*, 308(2), 403-9.
32. Duncan, A. M., Phipps, W. R., & Kurzer, M. S. (2003). Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17(2), 253-71.
33. Durrington, P. N., Mackness, B., & Mackness, M. I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(4), 473-80.
34. Eisenberg, S. (1984). High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*, 25(10), 1017-58.
35. Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 268(16), 11811-6.

36. Erbs, S., Linke, A., & Hambrecht, R. (2006). Effects of exercise training on mortality in patients with coronary heart disease. *Coron Artery Dis*, 17(3), 219-25.
37. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F. et al. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, 105(8), 1049-56.
38. Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327-58.
39. Fox, A. A., Thompson, J. L., Butterfield, G. E., Gylfadottir, U., Moynihan, S., & Spiller, G. (1996). Effects of diet and exercise on common cardiovascular disease risk factors in moderately obese older women. *Am J Clin Nutr*, 63(2), 225-33.
40. Fuhrman, B., Volkova, N., & Aviram, M. (2002). Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*, 161(2), 307-16.
41. Fukui, T., Folz, R. J., Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 55(2), 239-49.

42. Giannopoulou, I., Ploutz-Snyder, L. L., Carhart, R., Weinstock, R. S., Fernhall, B., Goulopoulou, S. et al. (2005). Exercise is required for visceral fat loss in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(3), 1511-8.
43. Glomset, J. A. (1968). The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, 9(2), 155-67.
44. Goodman-Gruen, D., & Kritz-Silverstein, D. (2001). Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr*, 131(4), 1202-6.
45. Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-USmar, V., & Moncada, S. (1993). Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett*, 330(2), 181-5.
46. Greendale, G. A., Lee, N. P., & Arriola, E. R. (1999). The menopause. *Lancet*, 353(9152), 571-80.
47. Grodstein, F., Manson, J. E., Colditz, G. A., Willett, W. C., Speizer, F. E., & Stampfer, M. J. (2000). A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med*, 133(12), 933-41.
48. Haberland, M. E., Olch, C. L., & Folgeman, A. M. (1984). Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the

- scavenger receptor of human monocyte macrophages . *J Biol Chem*, 259(18), 11305-11.
49. Hale, G., Paul-Labrador, M., Dwyer, J. H., & Merz, C. N. (2002). Isoflavone supplementation and endothelial function in menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 56(6), 693-701.
 50. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 280(1), 1-8.
 51. Hambrecht, R., Wolf, A., Gielen, S., Linke, A., Hofer, J., Erbs, S. et al. (2000). Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 342(7), 454-60.
 52. Hayase, H., Nomura, S., Abe, T., & Izawa, T. (2002). Relation between fat distributions and several plasma adipocytokines after exercise training in premenopausal and postmenopausal women. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*, 21(2), 105-13.
 53. Hazell, L. J., & Stocker, R. (1993). Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J*, 290 (Pt 1), 165-72.
 54. Hunter, G. R., Kekes-Szabo, T., Treuth, M. S., Williams, M. J., Goran, M., & Pichon, C. (1996). Intra-abdominal adipose tissue, physical activity and cardiovascular risk in pre- and post-menopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20(9), 860-5.

55. Ibanez, J., Izquierdo, M., Arguelles, I., Forga, L., Larrion, J. L., Garcia-Unciti, M. et al. (2005). Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(3), 662-7.
56. Isherwood, S. G., Williams, C. M., & Gould, B. J. (1997). Apolipoprotein B-48 as a marker for chylomicrons and their remnants: studies in the postprandial state. *Proc Nutr Soc*, 56(1B), 497-505.
57. Itabe, H. (2002). [Atherosclerosis and sensitive determination of oxidized LDL using monoclonal antibody]. *Yakugaku Zasshi*, 122(10), 745-53.
58. Jensen, J., Nilas, L., & Christiansen, C. (1990). Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas*, 12(4), 321-31.
59. Kang, S. M., Kwon, H. M., Hong, B. K., Kim, D., Kim, I. J., Choi, E. Y. et al. (2000). Expression of leptin receptor (Ob-R) in human atherosclerotic lesions: potential role in intimal neovascularization. *Yonsei Med J*, 41(1), 68-75.
60. Khalil, A. (2002). [Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis]. *Can J Physiol Pharmacol*, 80(7), 662-9.
61. Kinlay, S., Fang, J. C., Hikita, H., Ho, I., Delagrang, D. M., Frei, B. et al. (1999). Plasma alpha-tocopherol and coronary endothelium-dependent vasodilator function. *Circulation*, 100(3), 219-21.

62. Komatsu, T., Chiba, T., Yamaza, H., To, K., Toyama, H., Higami, Y. et al. (2006). Effect of leptin on hypothalamic gene expression in calorie-restricted rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(9), 890-8.
63. Konstantinides, S., Schafer, K., Koschnick, S., & Loskutoff, D. J. (2001). Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest*, 108(10), 1533-40.
64. Kontush, A., & Chapman, M. J. (2006). Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 3(3), 144-53.
65. Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschutter, A., & Beisiegel, U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 37(7), 1436-48.
66. Krazeisen, A., Breitling, R., Moller, G., & Adamski, J. (2002). Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. *Adv Exp Med Biol*, 505, 151-61.
67. Kronenberg, F., & Fugh-Berman, A. (2002). Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*, 137(10), 805-13.
68. Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S. et al. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the

- principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 277(51), 49982-8.
69. Lamb, D. J., Mitchinson, M. J., & Leake, D. S. (1995). Transition metal ions within human atherosclerotic lesions can catalyse the oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *FEBS Lett*, 374(1), 12-6.
 70. Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis*, 12(6), 455-61.
 71. Lemay, A., Dodin, S., Kadri, N., Jacques, H., & Forest, J. C. (2002). Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet Gynecol*, 100(3), 495-504.
 72. Lewis, S. J. (2002). Cardiovascular disease in postmenopausal women: myths and reality. *Am J Cardiol*, 89(12A), 5E-10E; discussion 10E-11E.
 73. Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L. et al. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 11(4), 376-81.
 74. Lock, M., Kaufert, P., & Gilbert, P. (1988). Cultural construction of the menopausal syndrome: the Japanese case. *Maturitas*, 10(4), 317-32.
 75. Lucas, E. A., Wild, R. D., Hammond, L. J., Khalil, D. A., Juma, S., Daggy, B. P.

- et al. (2002). Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4), 1527-32.
76. Mackness, B., Durrington, P. N., & Mackness, M. I. (1998). Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 31(3), 329-36.
 77. MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., & Thompson, J. A. (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, 37(6), 1613-22.
 78. Marklund, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest*, 74(4), 1398-403.
 79. Martin, L. J., Jones, P. J., Considine, R. V., Su, W., Boyd, N. F., & Caro, J. F. (1998). Serum leptin levels and energy expenditure in normal weight women. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(2), 237-41.
 80. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10), 577-86.
 81. Mates, J. M., Perez-Gomez, C., & Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32(8), 595-603.

82. McElveen, J., Mackness, M. I., Colley, C. M., Peard, T., Warner, S., & Walker, C. H. (1986). Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 32(4), 671-3.
83. McLarty, A., Mann, N., Lawson, W. E., & Foster, A. (2003). Womens heart health series: a mini-symposium. *Med Sci Monit*, 9(6), RA103-10.
84. Mertens, A., Verhamme, P., Bielicki, J. K., Phillips, M. C., Quarck, R., Verreth W. et al. (2003). Increased Low-Density Lipoprotein Antioxydant Defense Are Associated With Increased Macrophase Homing and Atherosclerosis in Dyslipidemic Obese Mice. Vol. 107, 1640-1646.
85. Miller J. Nicholas. (1998). Nonvitamin plasma antioxidants. Donald Armstrong *Free Radical and Antioxydant protocols* (Vol. 108pp. 285-297).
86. Miller NJ & Pangaga G. Antioxidant Activity of Low-Density Lipoprotein. Amstrong Donald *Free Radical and Antioxydant Protocols* (Humana Press ed., Vol. 108p. 327).
87. Ming-Lin Liu. (2002). LDL oxidation and LDL particle size in the development of atherosclerosis. *Academic dissertation* (pp. 1-86).
88. Mircescu, G., Capusa, C., Stoian, I., Vargolici, B., Barbulescu, C., & Ursea, N. (2005). Global assessment of serum antioxidant status in hemodialysis patients. *J Nephrol*, 18(5), 599-605.
89. Nofer, J. R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A.

- et al. (2001). Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*, 276(37), 34480-5.
90. Nofer J-R, K. B. F. M. L. A. G. v. E. A. (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 161, 1-16.
 91. Oda, A., Taniguchi, T., & Yokoyama, M. (2001). Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci*, 47(3), 141-50.
 92. Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W. et al. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(4), 1372-6.
 93. Paragh, G., Asztalos, L., Seres, I., Balogh, Z., Locsey, L., Karpati, I. et al. (1999). Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron*, 83(2), 126-31.
 94. Poirier, P., & Despres, J. P. (2001). Exercise in weight management of obesity. *Cardiol Clin*, 19(3), 459-70.
 95. Prior JC. (1998). Perimenopause: The Complex Endocrinology of the Menopausal transition. Vol. 19(4), 397-428.
 96. Proctor, S. D., & Mamo, J. C. (2003). Intimal retention of cholesterol derived from apolipoprotein B100- and apolipoprotein B48-containing

- lipoproteins in carotid arteries of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(9), 1595-600.
97. Quehenberger, P., Exner, M., Sunder-Plassmann, R., Ruzicka, K., Bieglmayer, C., Endler, G. et al. (2002). Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res*, 90(6), 711-8.
 98. Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G., & Steinberg, D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(9), 2995-8.
 99. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 266(7), 4244-50.
 100. Rendell, M., Hulthen, U. L., Tornquist, C., Groop, L., & Mattiasson, I. (2001). Relationship between abdominal fat compartments and glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(2), 744-9.
 101. Reynisdottir, S., Langin, D., Carlstrom, K., Holm, C., Rossner, S., & Arner, P. (1995). Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci (Lond)*, 89(4), 421-9.
 102. Rose, R. C., & Bode, A. M. (1995). Analysis of water-soluble antioxidants by

- high-pressure liquid chromatography. *Biochem J*, 306 (Pt 1), 101-5.
103. Rossi, R., Grimaldi, T., Origliani, G., Fantini, G., Coppi, F., & Modena, M. G. (2002). Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 32(5-6), 325-8.
104. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L. et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial . *JAMA*, 288(3), 321-33.
105. Rothblat, G. H., de la Llera-Moya, M., Favari, E., Yancey, P. G., & Kellner-Weibel, G. (2002). Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis*, 163(1), 1-8.
106. Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res*, 26(1), 63-70.
107. Sandstrom, J., Nilsson, P., Karlsson, K., & Marklund, S. L. (1994). 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 269(29), 19163-6.
108. Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*, 49(1), 7-30.

109. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr, Seeley, R. J., & Baskin, D. G.
(2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778),
661-71.
110. Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P. B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B.,
Jakate, A. S. et al. (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response
effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at
physiologically typical dietary intakes. *J Nutr*, 133 (4), 1027-35.
111. Setchell, K. D., & Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and
relevance to human health. *J Nutr*, 129(3), 758S-767S.
112. Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., Rizza, R. A., Coenen-
Schimke, J. M. et al. (2003). Impact of aerobic exercise training on age-
related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity.
Diabetes, 52(8), 1888-96.
113. Sipila, S., Taaffe, D. R., Cheng, S., Puolakka, J., Toivanen, J., & Suominen, H.
(2001). Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical
exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized
placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond)*, 101(2), 147-57.
114. Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hulten, L. M., Wiklund, O.,
Innerarity, T. L. et al. (2002). Subendothelial retention of atherogenic
lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417(6890), 750-4.
115. Stallknecht, B., Larsen, J. J., Mikines, K. J., Simonsen, L., Bulow, J., & Galbo, H.

- (2000). Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(2), E376-85.
116. Stocker, R., Bowry, V. W., & Frei, B. (1991). Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5), 1646-50.
 117. Sturdee, D. W. (1997). Newer HRT regimens. *Br J Obstet Gynaecol*, 104(10), 1109-15.
 118. Swain, J., & Gutteridge, J. M. (1995). Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. *FEBS Lett*, 368(3), 513-5.
 119. Tang, C., Vaughan, A. M., & Oram, J. F. (2004). Janus kinase 2 modulates the apolipoprotein interactions with ABCA1 required for removing cellular cholesterol. *J Biol Chem*, 279(9), 7622-8.
 120. Tchernof, A., Poehlman, E. T., & Despres, J. P. (2000). Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab*, 26(1), 12-20.
 121. Thomas, J. P., Maiorino, M., Ursini, F., & Girotti, A. W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem*, 265(1), 454-61.

122. Tomas, M., Latorre, G., Senti, M., & Marrugat, J. (2004). [The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis]. *Rev Esp Cardiol*, 57(6), 557-69.
123. Tormala, R. M., Nikander, E., Tiitinen, A., Vaisanen-Tommiska, M., Ylikorkala, O., & Mikkola, T. S. (2006). Serum cholesterol efflux potential in postmenopausal women treated with isolated isoflavones. *Menopause*, 13(1), 96-101.
124. *Principes d'anatomie et de physiologie*. (2001). (De Boeck University ed.).
125. Tulenko, T. N., & Sumner, A. E. (2002). The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol*, 9(6), 638-49.
126. Uesugi, T., Fukui, Y., & Yamori, Y. (2002). Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr*, 21(2), 97-102.
127. Warren, M. P., Shortle, B., & Dominguez, J. E. (2002). Use of alternative therapies in menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 16(3), 411-48.
128. Watson, A. D., Berliner, J. A., Hama, S. Y., La Du, B. N., Faull, K. F., Fogelman, A. M. et al. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 96(6), 2882-91.

129. Wich, B. K., & Carnes, M. (1995). Menopause and the aging female reproductive system. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 24(2), 273-95.
130. Wilson, T. A., Meservey, C. M., & Nicolosi, R. J. (1998). Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. *Atherosclerosis*, 140(1), 147-53.
131. Winterbourn, C. C., Vissers, M. C., & Kettle, A. J. (2000). Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, 7(1), 53-8.
132. Wu, D., Koga, T., Martin, K. R., & Meydani, M. (1999). Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis*, 147(2), 297-307 .
133. Xu, X., Duncan, A. M., Wangen, K. E., & Kurzer, M. S. (2000). Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(8), 781-6.
134. You T, R. A. N. BJ. (2004). The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation . 89(11), 5517-22.
135. Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2), 358-62.

136. Zannis V. I. , Krieger M. , & Chroni A. (2005). Role of apoA-1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL.